

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

SUR LES RAPPORTS ENTRE LES PROCESSUS CHIMIQUES ET PHYSIQUES DANS LA CONTRACTION MUSCULAIRE (1)

par OTTO MEYERHOF.

*(Institut de Physiologie du Kaiser Wilhelm Institut
für Medizinische Forschung, Heidelberg.)*

Le problème des rapports entre les processus chimiques et physiques dans le muscle a été, depuis les expériences de Galvani sur le muscle de grenouille et la découverte de la production de chaleur par Helmholtz, l'un des sujets de prédilection de la physiologie. Aujourd'hui, nous pouvons nous demander de façon plus précise : Quels sont les processus chimiques qui se trouvent à la base de la contraction musculaire ? Quels sont les changements physiques liés directement à ces processus ? Le but final d'une telle recherche serait une théorie de la contraction musculaire, c'est-à-dire la représentation de la voie par laquelle les processus chimiques fournissent l'énergie qui se transforme en travail mécanique. Nous sommes encore bien loin d'atteindre ce but. Nos connaissances ne nous fournissent actuellement que quelques éléments, qui formeront peut-être dans l'avenir l'une des parties constitutives d'une telle théorie. Si nous nous bornons à traiter la question posée, il faut d'abord

1. Conférence faite à la Faculté des Sciences de l'Université de Paris le 28 avril 1934.

écarter de notre sujet tous les phénomènes concernant les processus d'excitation et d'irritation, tels qu'ils ont été étudiés en France par Lapique avec tant de succès. Ces phénomènes ne sont pas spécifiques pour le processus de la mécanique musculaire : ils précèdent la contraction. Nous ne nous occuperons pas non plus de la dernière phase de la chaîne des transformations d'énergie, du processus mécanique lui-même. Nous voulons envisager uniquement ce qui se passe entre ces deux phénomènes extrêmes.

Rappelons-nous d'abord ce que nous avons appris sur les processus chimiques coïncidant avec l'action musculaire. Les méthodes chimiques, appliquées au muscle en activité, se heurtent à cette difficulté que nous ne pouvons pas tuer le muscle instantanément. La meilleure méthode pour fixer le muscle dans un état défini est encore la méthode, établie surtout par Emden, qui consiste à congeler le muscle par immersion dans l'air liquide. Mais, même par ce procédé, appliqué par exemple à un gastro-cnémien de grenouille de moyenne grandeur, il faut encore plusieurs secondes pour que tous les processus chimiques soient tout à fait arrêtés. C'est plusieurs fois la durée d'une contraction. Or, nous devons admettre que le processus déclenchant immédiatement l'état de contraction est rendu réversible pendant la décontraction. Il en résulte pour le tétanos que ce processus chimique primaire, c'est-à-dire celui qui fournit immédiatement l'énergie de la contraction, n'est pas capable d'une sommation plus forte que ne l'est la sommation mécanique des secousses consécutives. Par conséquent, une grande partie des changements chimiques primaires doit être constamment rendue réversible, même pendant un tétanos de plusieurs secondes.

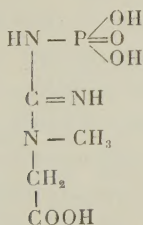
Mais, malgré ces restrictions, nous avons progressivement appris à connaître, grâce aux méthodes purement chimiques, les faits suivants :

1° La respiration, l'oxydation des substances nutritives, n'est pas le processus fournissant immédiatement l'énergie, elle ne sert qu'à la restitution. La contraction se produit également en absence d'oxygène, grâce à des processus de dégradation qui fournissent l'énergie. Dans ce cas, il y a formation d'acide lactique par décomposition de glycogène.

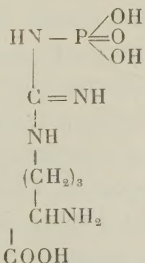
2° La formation d'acide lactique n'est pas non plus le processus fournissant immédiatement l'énergie, car, ainsi qu'il a été démontré, surtout par Embden, cette formation continue encore d'une manière appréciable après la contraction, et les expériences bien connues de Einar Lundsgaard ont montré qu'on peut inhiber entièrement la formation d'acide lactique en empoisonnant le muscle par l'acide iodacétique, sans que le muscle cesse de produire, même en anaérobiose, une certaine quantité de travail. Dans ce travail, l'acide créatine-phosphorique, [découvert par Eggleton et par Fiske, se décompose en plus grande quantité que dans le muscle normal. C'est cette décomposition qui fournit ici l'énergie de la contraction, tandis que la formation d'acide lactique dans le muscle normal sert à la resynthèse partielle de l'acide créatine-phosphorique décomposé, et que l'oxygène consommé sert à la resynthèse de l'acide lactique en glycogène.

Est-ce alors la décomposition de l'acide créatine-phosphorique qui fournit directement l'énergie? Appuyé sur des récentes expériences de K. Lohmann, que je vais vous exposer, j'arriverai à la conclusion suivante :

3° La décomposition de l'acide créatine-phosphorique n'est très probablement pas non plus le processus fournissant directement l'énergie ; elle est plutôt une espèce de processus de restitution. Cependant un autre processus, à savoir la décomposition de l'acide adénylpyrophosphorique, présent dans le muscle, en acide adénylique et acide phosphorique, coïncide exactement dans le temps avec la contraction ; ces composés sont évidemment retransformés lors de la décontraction.



Acide créatine phosphorique.



Acide arginine-phosphorique.

FIG. 1.

L'acide créatine-phosphorique, et l'acide arginine-phosphorique que l'on trouve à la place de celui-là dans les muscles des invertébrés, ont une constitution très voisine. Nous réunissons les deux corps sous le nom de phosphagènes proposé par Eggleton.

L'acide adénylpyrophosphorique découvert par Lohmann est constitué par l'acide adénylique auquel est, semble-t-il, attaché, immédiatement à l'extrémité phosphorique, un groupement pyrophosphorique. Ce groupement pouvant être facilement séparé, il peut se former de l'acide adénylique libre. De celui-ci, on sépare facilement le groupement aminé de l'adénine sous forme d'ammoniaque et il apparaît de l'acide inosique.

L'hypothèse d'après laquelle le dédoublement de l'acide

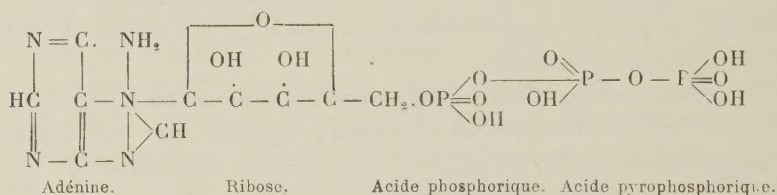


FIG. 2.

adénylpyrophosphorique précède le clivage de l'acide créatine-phosphorique, lors de la contraction, a été formulée par K. Lohmann et appuyée non plus sur des expériences faites sur le muscle vivant, mais sur des expériences effectuées sur l'extrait diastasique du muscle. On a établi, il y a déjà plusieurs années, que nombre de réactions chimiques couplées continuent dans l'extrait musculaire dépourvu de cellules, réactions qui peuvent intervenir dans le transport d'énergie dans le muscle. Ainsi, dans l'extrait, on est arrivé à provoquer une resynthèse d'acide créatine-phosphorique à partir de créatine et d'acide phosphorique, par la formation simultanée d'acide lactique à partir du glycogène. La synthèse d'acide créatine-phosphorique exige l'apport de 12.000 calories par molécule-gramme. La formation de l'acide lactique fournit 18 à 19.000 calories par molécule-gramme d'acide lactique. Même sans formation simultanée d'acide lactique, l'acide créatine-phosphorique peut être resynthétisé dans l'extrait musculaire, lorsqu'on ajoute de

l'acide adénylpyrophosphorique en milieu faiblement alcalin. Lors du dédoublement de l'acide adénylpyrophosphorique en acide adénylique et en deux molécules d'acide phosphorique, 24.000 calories sont dégagées sans séparation d'ammoniaque; il se libère donc par molécule-gramme d'acide phosphorique juste autant de calories qu'en exige la resynthèse d'une molécule-gramme d'acide créatine-phosphorique à partir de ses fractions.

K. Lohmann a découvert la réaction inverse, plus importante encore au point de vue de notre problème. Il a démontré que l'acide créatine-phosphorique n'est pas du tout décomposé par l'enzyme musculaire dans le milieu neutre, à moins qu'en même temps l'acide adénylique ne soit synthétisé avec du phosphate anorganique en acide adénylpyrophosphorique. Nous tiendrons compte des réactions suivantes :

- I. 2 ac. créat.-phosph. = 2 créat. + 2 phosph. + 24.000 cal.
- II. 1 ac. adényl. + 2 phosph. = 1 ac. adénylpyroph. - 24.000 cal.
- III. 1 ac. adényl. + 2 ac. créat.-phosph. \rightleftharpoons 1 ac. adénylpyroph. + 2 créat. \pm 0 cal.

FIG. 3.

L'équation n° 1 montre d'abord la décomposition de 2 molécules-grammes d'acide créatine-phosphorique en ses constituants. Cette décomposition fournit 24.000 calories. Mais elle ne peut avoir lieu que si, en même temps, une molécule-gramme d'acide adénylpyrophosphorique est synthétisée en proportion stoechiométrique, en absorbant 24.000 calories (ainsi que le montre l'équation 2). Des équations 1 et 2, résulte la réaction couplée 3, d'après laquelle 1 molécule d'acide adénylique réagit avec 2 molécules d'acide créatine-phosphorique en donnant 1 molécule d'acide adénylpyrophosphorique et 2 molécules de créatine, sans libération de phosphate anorganique et sans production de chaleur. Cette réaction couplée évolue dans un milieu neutre de gauche à droite. Elle peut aussi se dérouler en sens inverse dans un milieu alcalin; mais, ici, il y a une différence, à savoir que l'acide adénylpyrophosphorique peut être décomposé par la voie diastasique, lorsqu'il se trouve seul dans l'extrait, tandis que l'acide créatine-phosphorique ne peut l'être que par la voie que je viens d'indiquer. Par conséquent, l'acide adényl-

pyrophosphorique est le coferment de la décomposition de l'acide créatine-phosphorique.

Nous nous trouvons donc, dans le muscle vivant, en présence de la situation suivante : L'acide créatine-phosphorique ne peut pas être décomposé, sans que l'acide adénylique ne soit transformé par synthèse en acide adénylpyrophosphorique. Or, il n'existe pas d'acide adénylique libre dans le muscle au repos ; par conséquent, il doit y avoir tout d'abord, lors de la mise en action de l'excitation, dédoublement d'acide adénylpyrophosphorique en acide adénylique et acide phosphorique. Ce n'est qu'à partir de ce moment que l'acide créatine-phosphorique peut se décomposer, en même temps que l'acide adénylpyrophosphorique prend naissance par synthèse. Or, si le clivage de l'acide adénylpyrophosphorique est intercalé entre le moment de l'excitation et celui de la décomposition de l'acide créatine-phosphorique, nous pouvons conclure avec Lohmann que, selon toute probabilité, c'est cette réaction qui coïncide dans le temps avec le phénomène mécanique.

On a déjà souvent énoncé l'opinion que, pour trouver la source immédiate du travail produit, il ne faut tenir compte que de processus chimiques n'apparaissant pas dans le bilan chimique de la fatigue musculaire, parce que ces processus doivent subir une marche inverse lors de la décontraction. Il va de soi qu'une telle opinion, énoncée sous cette forme générale, sans qu'on puisse fournir de preuves positives d'une réaction définie, est dépourvue de valeur pour le progrès de nos connaissances. Il en est autrement si l'on réussit à apporter une preuve expérimentale de l'existence d'un processus défini, qui échappe à l'observation directe dans le muscle vivant.

Les phénomènes physico-chimiques et physiques, à la description desquels je procéderai maintenant, ne font pas connaître avec certitude le processus chimique primaire producteur d'énergie, mais ils permettent une confirmation quantitative et une précision des connaissances acquises par la voie chimique. Je passerai sur les mesures de la chaleur de contraction, telles qu'elles ont été effectuées avec tant de précision et de succès, surtout par Hill. En jonction avec des mesures calorimétriques, elles ont permis d'établir les premières idées sur la chimie de la contraction musculaire. Mais elles ne peuvent

évidemment fournir aucune notion sur la nature spéciale du processus chimique, puisque la chaleur n'est que la forme la plus générale de l'énergie.

Je veux cependant exposer brièvement les recherches de

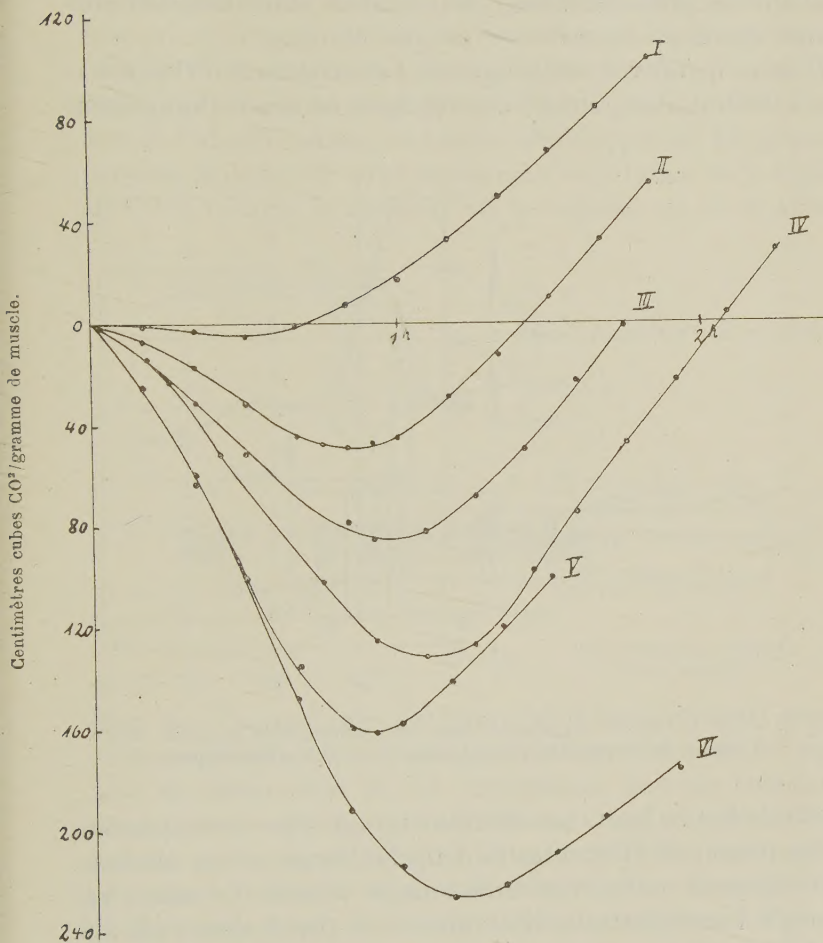


FIG. 4.

Lipmann, effectuées dans notre laboratoire il y a déjà quelques années, sur l'évolution du pH dans la fatigue. Les changements du pH dans le muscle vivant ont été déterminés par les mesures de l'absorption de CO_2 , dans une atmosphère à pression constante d'acide carbonique. Quand le [muscle devient plus alcali-

lin, l'acide carbonique se combine; quand il s'acidifie, du CO^2 se dégage. Contrairement à d'anciennes idées sur l'acidification du muscle en activité, on trouve que, lors d'une série de secousses isolées, en anaérobiose, le muscle devient d'abord plus alcalin, puis s'acidifie, l'alcalinisation étant d'autant plus grande que la pression de CO^2 est plus élevée.

C'est ce qu'on voit sur la figure 4, l'absorption de CO^2 , c'est-à-dire l'alcalinisation, étant tracée de haut en bas, le dégagement

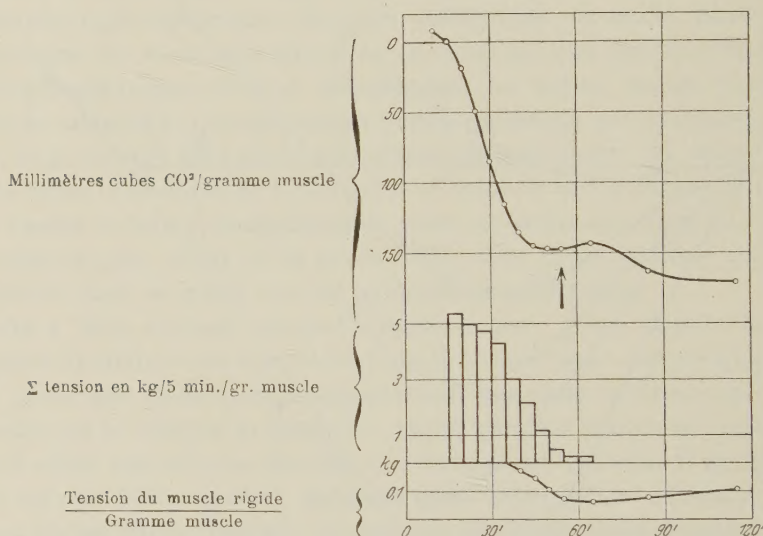


FIG. 5. — 33 % CO^2/N^2 . Excitation dans une atmosphère gazeuse sèche. A partir de la rigidité l'absorption de CO^2 augmente peu.

de CO^2 de bas en haut. Les différents graphiques correspondent à des pressions différentes de CO^2 . Le temps est en abscisse, les excitations sont portées trois fois par minute. Le tracé 2 par exemple correspond au pH du muscle *in situ*, à savoir pH 7,2. Ces tracés peuvent être interprétés approximativement, si l'on considère l'étendue de la décomposition de l'acide créatine-phosphorique et la formation de l'acide lactique. Lors de la décomposition de l'acide créatine-phosphorique, de nouveaux équivalents basiques sont mis en liberté, ce phénomène augmentant de plus en plus entre pH = 8 et pH = 6. De plus, au début de la série de secousses aboutissant à la fatigue, c'est la

décomposition de l'acide créatine-phosphorique qui est prépondérante, plus tard c'est la formation d'acide lactique, de telle sorte qu'à l'alcalinisation succède peu à peu une acidification. Et, en effet, on trouve, dans les muscles empoisonnés par l'acide iodacétique, uniquement une alcalinisation, alcalinisation qui ne change plus dès le moment où est atteinte la rigidité. Ceci est très net sur le tableau ci-contre (fig. 5), sur lequel on a tracé, au-dessous du graphique de l'absorption de CO_2 (c'est-à-dire de l'alcalinisation), la tension développée en kilogrammes par cinq minutes et, plus bas encore, l'évolution de la rigidité. La flèche indique le moment où la rigidité est au maximum.

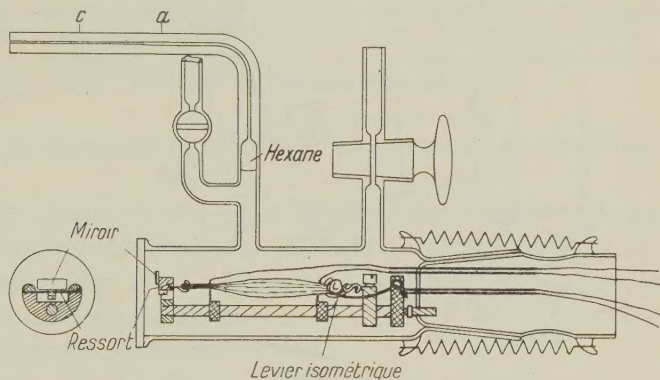


FIG. 6.

Bien que l'accord entre les équivalents basiques ainsi mesurés et ceux calculés ne soit pas quantitativement exact, il résulte tout de même déjà de ces expériences que les transformations trouvées par la voie chimique ne sont pas des *artefacts* qui se produiraient lorsqu'on tue le muscle, mais qu'elles présentent *in vivo* le même ordre de grandeur. Ce serait cependant un malentendu de conclure de ces graphiques à l'alcalinisation du muscle au moment de la contraction. Ces expériences ne prétendent pas rendre compte de ce qui se passe pendant la contraction, surtout dans les éléments contractiles proprement dits. Elles ne montrent que l'évolution du pH lors de la fatigue croissante du muscle considéré *in toto*.

Deux autres phénomènes physiques étudiés dans notre laboratoire pendant ces deux dernières années nous conduiront

plus loin. D'abord la diminution de volume de muscle. Vous savez que la contraction musculaire est essentiellement un changement de longueur accompagné d'une augmentation simultanée d'épaisseur. La controverse déjà ancienne sur la question de savoir si le muscle subit en même temps un changement de volume a été tranchée, au moins en principe, par le savant hongrois Ernst, qui a démontré qu'une petite diminution de volume a lieu, diminution qui est en relation avec la grandeur du travail produit. Mais les résultats de Ernst

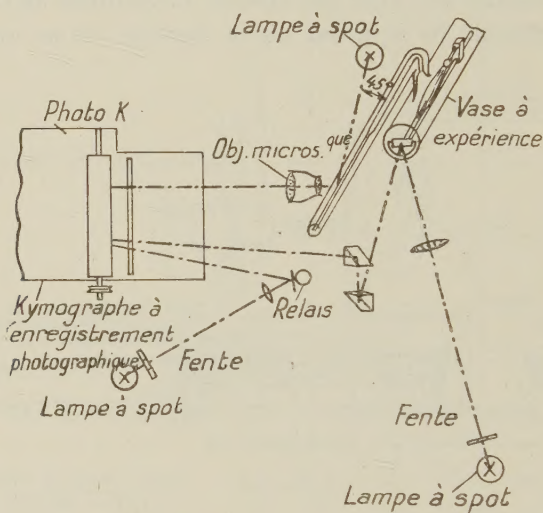


FIG. 7. — Dispositif schématique pour l'enregistrement optique du tracé de la variation de volume. En bas du cylindre, enregistrement du signal d'excitation; au-dessus, enregistrement de la tension ou du raccourcissement du muscle; en haut, enregistrement de la variation de volume.

n'étaient pas satisfaisants au point de vue quantitatif, et cet auteur a été amené à des conclusions erronées. Sa méthode de mesure du changement de volume du muscle a été beaucoup perfectionnée dans notre laboratoire. L'amplitude et l'allure dans le temps de la variation de volume ont pu être enregistrées par la photographie. Le muscle se trouve (fig. 6) dans un vase rempli de liquide, lequel est prolongé par un fin tube capillaire rempli d'hexane. Le ménisque de l'hexane est fortement éclairé et projeté avec précision par un objectif de microscope sur un kymographe photographique.

En même temps, on enregistre, soit la tension, soit le raccourcissement du muscle. On voit sur le schéma (fig. 7) le muscle attaché au levier isométrique. Un miroir est mastiqué sur le ressort et ses déplacements sont également photographiés. Je me borne à ne donner ici que quelques exemples typiques

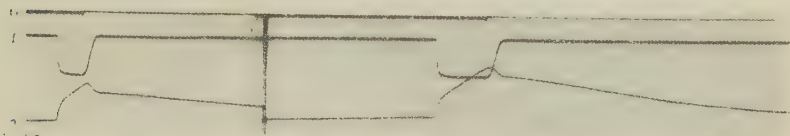


FIG. 8. — Diminution de volume et tension dans une contraction musculaire isométrique. Enregistrement photographique.

Tracé 0, signal de la fin de l'excitation; tracé 1, tension (de haut en bas); tracé 2, diminution de volume (de bas en haut); à gauche, tétanos de deux secondes; à droite, tétanos de quatre secondes.

parmi les nombreux graphiques obtenus sur des muscles normaux.

Le graphique supérieur enregistre la tension, l'augmentation de la tension étant traduite par une variation de haut en bas. Vous voyez (fig. 8) en premier lieu un tétanos de deux secondes, ensuite un tétanos de quatre secondes, dans la figure 9 on a enregistré des secousses isolées.

Le graphique inférieur enregistre le volume du muscle, la

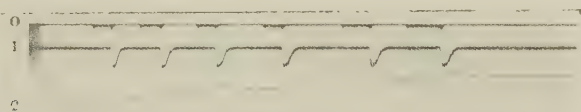


FIG. 9. — Secousses singulières. 0, enregistrement des excitations; 1 et 2, voir figure 8.

diminution de volume étant traduite par une variation de bas en haut. Nous voyons qu'il y a, dès l'établissement de la tension, une diminution de volume, et que cette diminution de volume va encore croissant lorsque la tension est maintenue par le tétanos, bien qu'à une allure plus lente qu'au début. Enfin, lors de la décontraction, il se produit un certain affaissement brusque de la courbe. Il y a un résidu, c'est-à-dire que le

volume musculaire n'est pas revenu à sa valeur initiale, laquelle ne tend à se rétablir que très lentement. Le cas des contractions isolées est semblable; on voit que les résidus

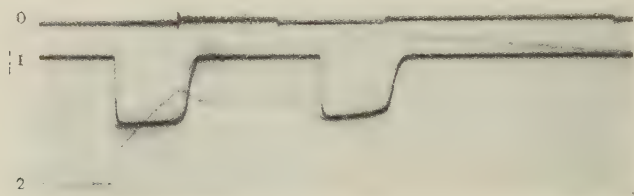


FIG. 10. — 2 tétanos consécutifs de quatre secondes.

Ligne 0, tracé des ouvertures du courant excitant; 1 et 2, voir figure 8. Ce tableau met en évidence la sommation des déplacements et en même temps la diminution de résidu plus rapide dans le deuxième tétanos que dans le premier.

s'additionnent. Cette sommation est visible encore dans le tétanos sur un autre tableau (fig. 10). Ici, un tétanos de quatre secondes est suivi d'un autre, après un délai de plusieurs secondes. La deuxième contraction de volume se superpose au

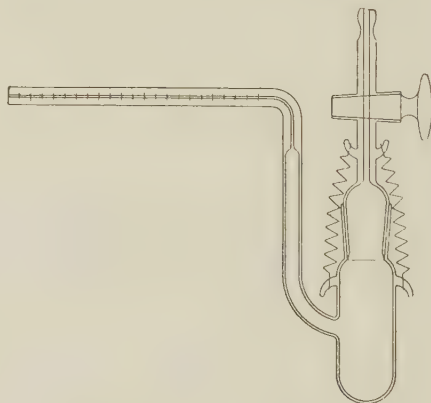


FIG. 11. — Dilatomètre pour expériences sur des muscles et des extraits musculaires.

résidu de la première pour donner au total un résidu presque double.

L'évolution de ce tracé du volume imposait la conclusion que son allure était en rapport avec les transformations chimiques. Cette conclusion a, depuis, été confirmée avec de plus en plus

de précision et d'exactitude. Il y avait surtout deux circonstances qui imposaient cette interprétation : 1° le volume,

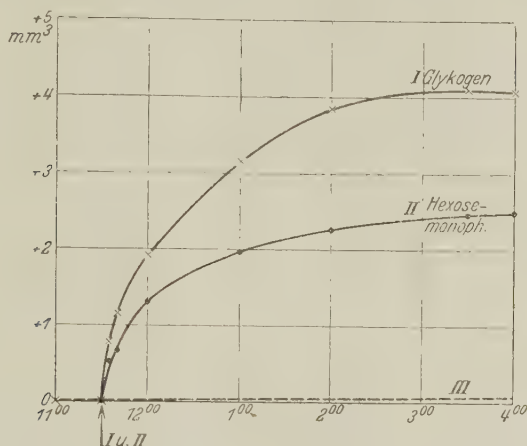


FIG. 12. — Dilatation de volume dans la décomposition enzymatique du glycogène (I) et de l'acide hexose-monophosphorique (II) en acide lactique : III, extrait musculaire seul.

Ordonnée, variation de volume en millimètre cube; abscisse, temps en heures; \wedge , addition du substrat.

comme nous l'avons vu, ne reste pas constant lors du maintien de la tension constante dans le télanos isométrique; il con-

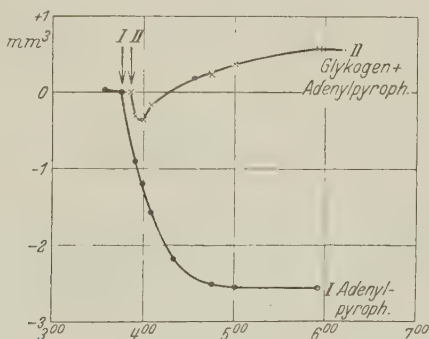


FIG. 13 — Voir figure 12.

I, variation de volume dans le cas de décomposition d'acide adénylpyrophosphorique; II, variation de volume dans le cas de décomposition d'acide adénylpyrophosphorique + glycogène.

tinue à décroître en raison linéaire du temps. Ceci correspond au fait que la tension ne peut être maintenue pendant un

tétanos que par une production continuelle d'énergie, laquelle évolue d'après Hill exactement en raison linéaire du temps ; 2° il reste, comme nous l'avons vu, un résidu considérable qui ne rétrocede que partiellement dans un délai d'une demi-minute à peu près. Ce résidu rappelle les processus de clivage mis en action par la contraction, mais qui continuent après cette contraction. Les changements de volume continuent aussi longtemps après la contraction qu'il y a, d'après les dosages

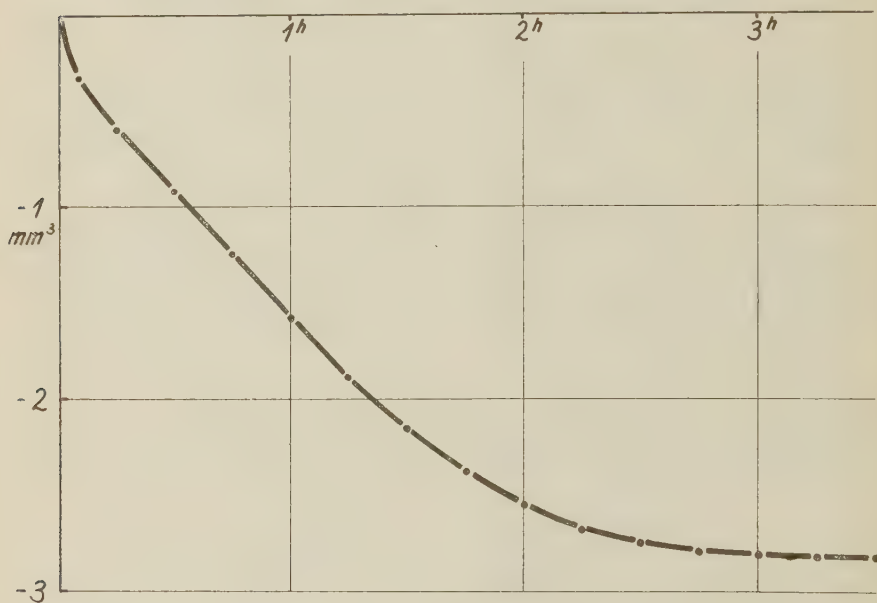


FIG. 14. — Diminution de volume dans le clivage enzymatique de l'acide créatine-phosphorique.

chimiques, resynthèse de l'acide créatine-phosphorique et formation différée d'acide lactique. Nous avons, à la suite de ces considérations, suivi par la voie dilatométrique les différents processus mentionnés de dégradation dans l'extrait diastasique. L'extrait enzymatique est versé dans des dilatomètres très simples (fig. 11), également pourvus d'un tube capillaire. Voici quelques-uns des graphiques ainsi obtenus (fig. 12-14). La décomposition du glycogène en acide lactique, de même que celle de l'acide hexosemono-phosphorique, entraîne une augmentation de volume. Ici l'augmentation est montrée par

un mouvement de bas en haut; la diminution par un mouvement de haut en bas. Le graphique reproduit l'allure exacte dans le temps de la décomposition diastasique. A partir de ces mesures, on peut calculer qu'il y a une augmentation de volume de 24 cent. cubes par molécule-gramme d'acide lactique. Les décompositions de l'acide adénylpyrophosphorique et de l'acide créatine-phosphorique vont en sens inverse.

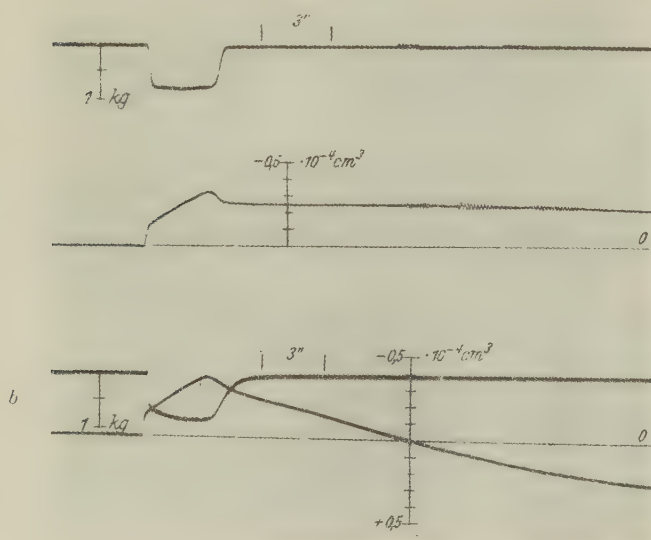


FIG. 15. — *a*, tracé de la variation de volume dans un tétanos de trois secondes effectué sur un gastrocnémien normal non fatigué. En haut, tension; en bas, volume. La courbe ascendante signale toujours une diminution (« contraction ») de volume, la courbe descendante une augmentation (« dilatation ») de volume; voir l'étalonnage. Poids du muscle : 0 gr. 85; longueur : 35 millimètres. Diminution minime du résidu.

b, tracé de la variation de volume correspondant à *a*, mais pris en huile de paraffine. Poids du muscle : 0 gr. 75; longueur, 34 millimètres. Diminution importante du résidu, ne s'arrêtant que trente secondes après le tétanos.

La décomposition de l'acide adénylpyrophosphorique produit, lors de la séparation du groupement pyrophosphorique, une diminution de volume de 21 cent. cubes. Il en est de même pour la séparation de l'ammoniaque. L'hydrolyse de l'acide créatine-phosphorique donne 14 c. c. 5 par molécule-gramme

(fig. 14). Ces changements de volume sont dus au changement de volume moléculaire des substances lors de la décomposition. En comparant ces chiffres à ceux obtenus sur le muscle vivant, on a pu calculer approximativement que la variation de volume était du même ordre de grandeur. Aussi a-t-on pu attribuer la diminution du volume dans le téτανos au clivage des acides adénylpyrophosphorique et créatine-phosphorique, et le retour à la normale à la dilatation due à la formation d'acide lactique.

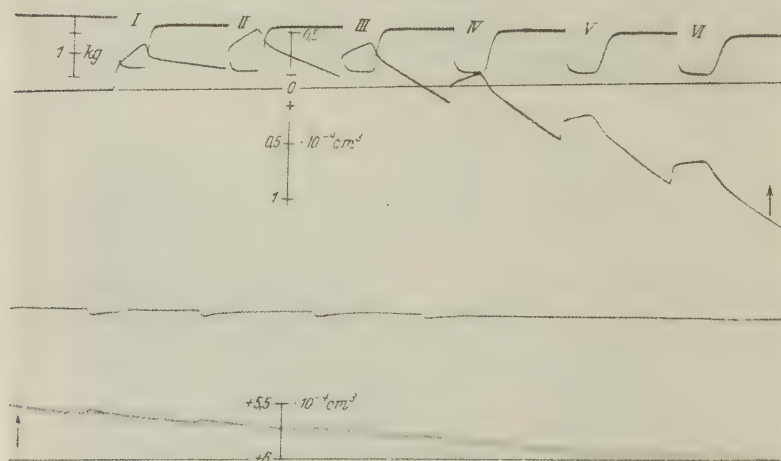


FIG. 16. — Les premiers et derniers téτανos de deux secondes d'une série aboutissant à la fatigue, effectués sur un gastro-cnémien normal plongé dans l'huile de paraffine. Au point \uparrow , l'image du ménisque a été remaniée suivant l'échelle indiquée.

Mais l'accord n'allait pas plus loin. En particulier la dilatation trouvée était beaucoup trop petite par rapport à la formation d'acide lactique.

C'est alors que mon collaborateur Hans Hartmann a eu l'idée de remplir le vase dilatométrique d'huile de paraffine au lieu de la solution de Ringer, pour empêcher le muscle de s'imbiber d'eau. Il a ainsi obtenu des tracés de volume correspondant exactement à ce qu'on attendait en raison des mesures effectuées sur les extraits diastasiques (fig. 15). La contraction évoluait, il est vrai, lors du premier téτανos presque exacte-

ment comme dans la solution de Ringer, mais le résidu rétrocé-
dait beaucoup plus vite, dans le tétanos suivant encore plus vite,
etc. C'est ce qu'on voit sur le tableau de la page précédente (fig. 16)
qui montre comment la diminution de volume est suivie d'une
augmentation progressive. Par conséquent, si l'on veut attri-
buer la diminution de volume en premier lieu à la décomposi-

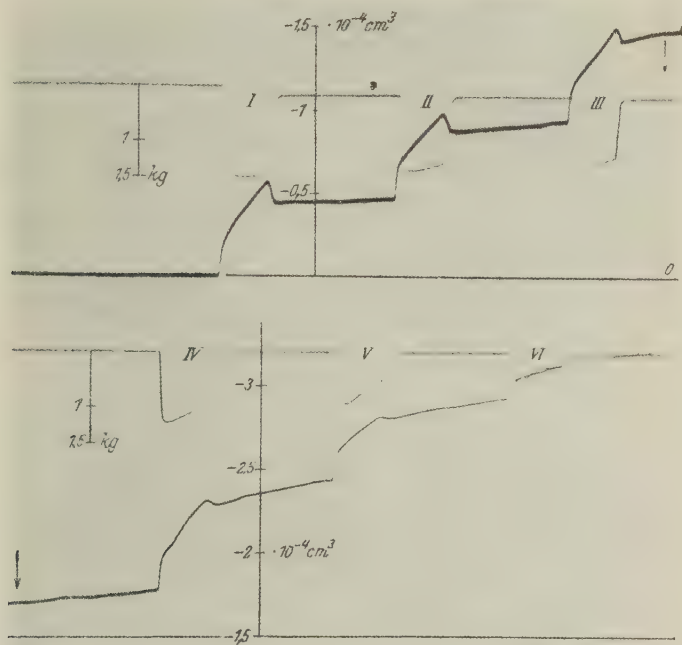


FIG. 17. — Tracé de la variation de volume dans 6 tétanos de deux secondes effectuées sur un muscle empoisonné par l'acide mono-iodacétique en solution de Ringer. Poids du muscle : 1 gr. 40; longueur : 30 millimètres (muscle correspondant contralatéral de celui de la figure 18). Au point \uparrow , l'image du ménisque a été remaniée suivant l'étalonnage indiqué. Somme des résidus, pas de diminution de volume; au contraire, à partir du tétanos II le résidu augmente « contraction » de volume supplémentaire, indiquant des processus d'imbibition.

tion de l'acide créatine-phosphorique, le résidu présent au moment de la décontraction doit correspondre à la décomposition du phosphagène à ce moment, diminuée d'une certaine dilatation causée par l'acide lactique. Dès maintenant, la

resynthèse de l'acide créatine-phosphorique est mise en marche, accompagnée de la formation différée d'acide lactique. Ceci tend à diminuer le résidu de façon que dans chacun des tétanos consécutifs l'abaissement sera plus fort, parce que la resynthèse de l'acide créatine-phosphorique devient de plus en plus complète, la formation de l'acide lactique de plus en plus abondante. En fin de compte, il doit en résulter une dilatation,

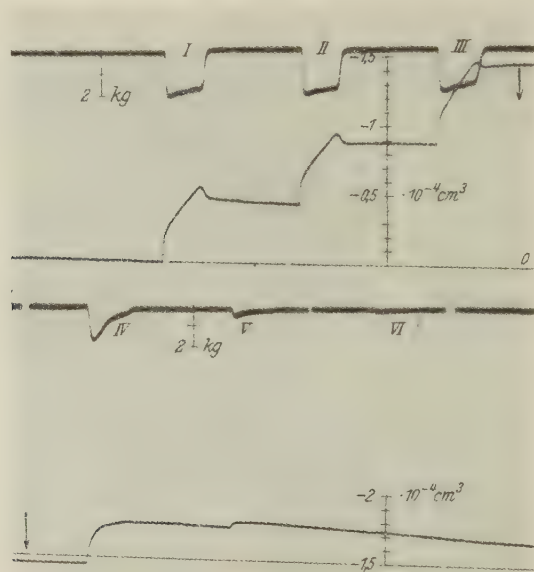


FIG. 18. — Tracé de la variation de volume dans une série de 6 tétanos de deux secondes chacun, effectués sur un muscle empoisonné par l'acide mono-iodacétique, plongé dans l'huile de paraffine. Poids du muscle : 1 gr. 39; longueur : 39 millimètres (muscle correspondant contralatéral de celui de la figure 17). Au point Δ l'image a été remaniée suivant l'étalement indiqué. Le tracé des résidus reste horizontal. Somme des résidus jusqu'au début de la rigidité.

puisque au total c'est la formation d'acide lactique qui l'emporte de beaucoup sur le clivage d'acide créatine-phosphorique. C'est exactement ce que nous constatons sur les tracés. Cette interprétation peut être soumise à une vérification par l'étude de l'enregistrement de la contraction du muscle intoxiqué par l'acide iodacétique, étude qui la confirme entièrement. Dans ce

cas, le résidu reste intact et tous les résidus s'additionnent, parce qu'ici il n'y a pas de formation d'acide lactique et pas de resynthèse de phosphagène. Il en est ainsi également dans les expériences effectuées en solution de Ringer, mais le phénomène est plus net dans les expériences effectuées dans l'huile de paraffine (fig. 17 et 18). Ici les résidus sont nettement au niveau horizontal et s'additionnent complètement. Ceci veut

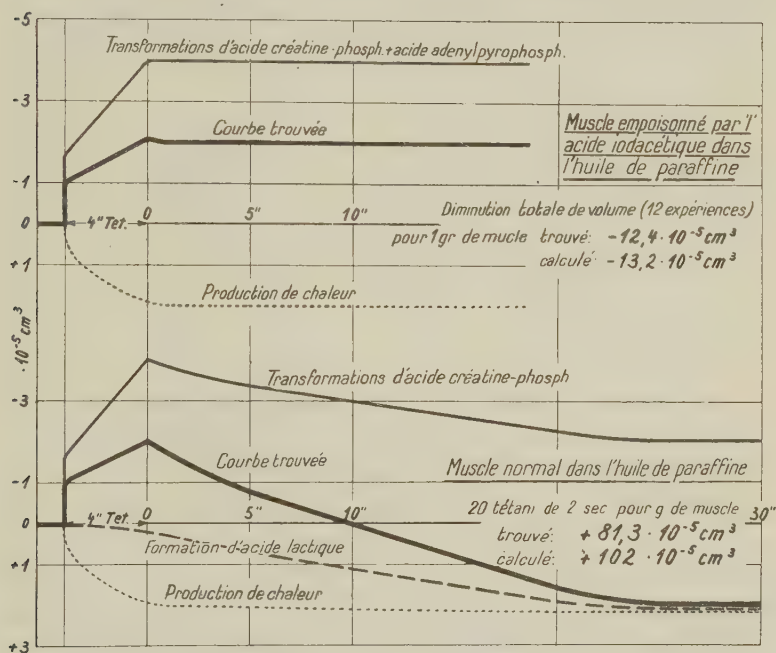


FIG. 19.

dire que dès la fin de la contraction il ne se passe plus rien, ce que confirme aussi l'analyse chimique.

Voici les tracés schématiques pris sur le muscle normal et sur le muscle empoisonné par l'acide iodacétique. Ici on a fait les dosages des transformations chimiques dans les muscles, sur lesquels des mesures de volume avaient été effectuées; on a également calculé la production de chaleur dont il faut tenir compte, particulièrement dans l'huile de paraffine, étant donné son grand coefficient de dilatation thermique. Les tracés effectifs des volumes sont la résultante des changements opposés

provoqués par les différents processus de décomposition d'une part, et par la production de chaleur de l'autre. Du côté droit du tableau on voit les changements obtenus, en fait, à la fin d'une série de contractions poursuivies jusqu'à la fatigue, et qui sont comparés à ceux calculés à partir des transformations chimiques. Il en résulte une concordance remarquablement bonne, étant données les conditions expérimentales (fig. 19).

Je relève le fait, que les tracés de volume ne permettent pas de distinguer si c'est le clivage de l'acide adénylpyrophosphorique ou celui de l'acide créatine-phosphorique qui est le pro-

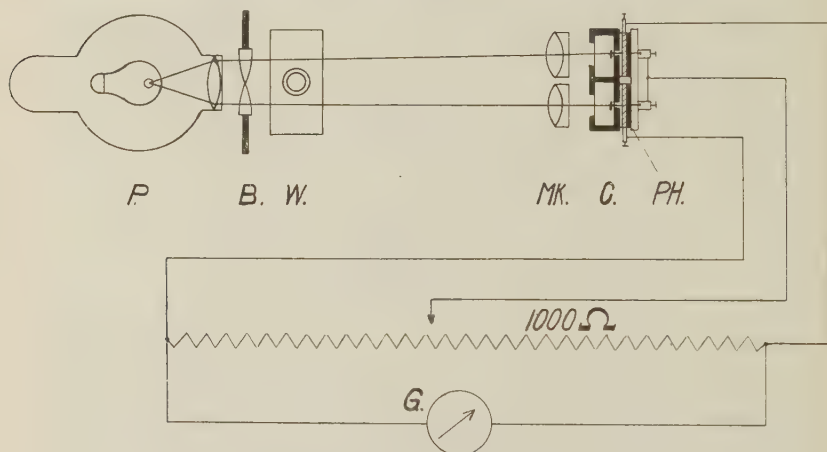


FIG. 20. — Dispositif photo-électrique.

P, lampe à spot; B, Biprisme; W, Cuve à l'eau; MK, Condenseurs de microscope; C, Cuvette; PH, Cellule photoélectrique; G, Galvanomètre.

cessus primaire. En enregistrant à grande vitesse des secousses isolées isométriques on arrive dans l'espace d'un σ à la coïncidence complète dans le temps entre l'allure de la tension et le tracé de volume. On est en droit d'en conclure qu'il existe bien un processus chimique accompagné d'une diminution de volume et d'un changement de l'état mécanique exactement synchrone.

Il y a encore une méthode physique très différente, développée dans notre laboratoire par A. v. Muralt, qui permet également de suivre l'allure dans le temps des transformations de l'acide créatine-phosphorique et de la formation de l'acide lactique, et

qui est aussi « exempte d'inertie » que la méthode dilatométrique. Cette méthode consiste à déterminer la transparence, c'est-à-dire à mesurer la valeur réciproque de l'extinction. A. v. Muralt a observé en collaboration avec E. v. Baeyer le fait surprenant, que la transparence du muscle change au cours d'une série de contractions anaérobies (fig. 20).

La transparence a été mesurée à l'aide d'une cellule photo-électrique, la transparence d'un couturier de grenouille étant comparée à celle d'une plaque de verre dépoli. Il ressort des

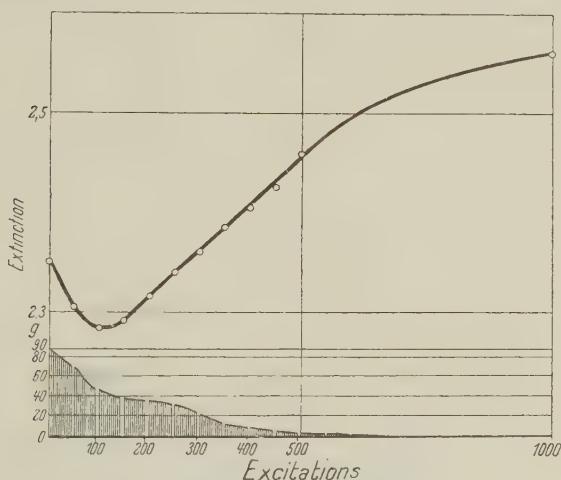


FIG. 21. — Série d'excitations en anaérobiose aboutissant à la fatigue. Couturier frais de *Rana esculenta* en solution de Ringer phosphatée, comparé au verre dépoli. Enregistrement de la tension. Excitations portées quatre fois par minute, chocs maxima d'ouverture, 8 volts. Lectures toutes les 50 excitations. Après 550 excitations, série ininterrompue de 450 excitations. Commencement : 10 h. 45; fin : 15 h. 15.

expériences faites sur des muscles normaux que, d'abord, la transparence s'accroît pendant les 100 premières contractions et diminue ensuite jusqu'à la fatigue complète (fig. 21).

En bas du tableau sont reproduites schématiquement les tensions en g des secousses isolées, chaque trait correspondant à 5 secousses. L'autre tracé est celui de la transparence, l'obscurcissement (c'est-à-dire l'accroissement de l'extinction) allant de bas en haut. D'abord la transparence augmente puis, après 100 contractions environ, elle diminue. Ce tracé rappelle for-

tement, comme on le voit, le tracé de changement de réaction que j'ai montré au début et, en effet, l'augmentation de la transparence est en rapport avec le clivage de l'acide créatine-phosphorique, la diminution de la transparence avec la formation d'acide lactique. Par conséquent, l'allure de la courbe sera très différente dans le muscle empoisonné par le iodacétate (fig. 22).

Pendant toute la série des secousses isométriques reproduite

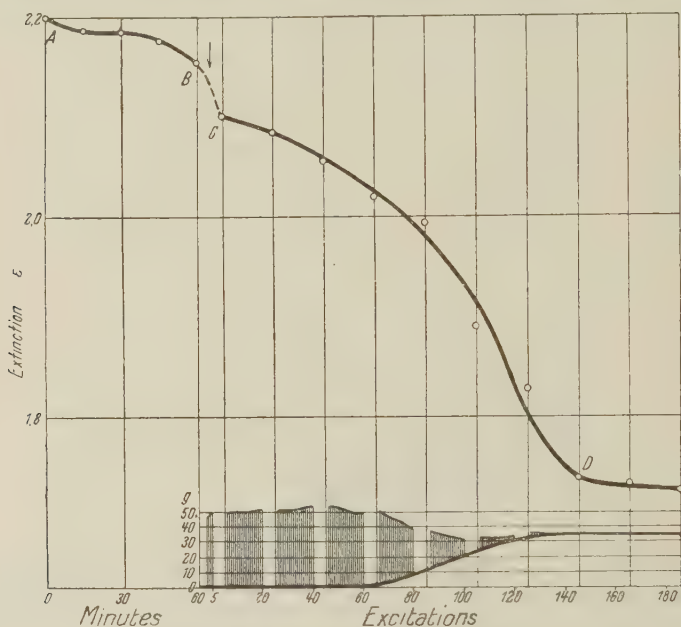


FIG. 22. — Empoisonnement par l'acide mono-iodacétique, couturier pâle et frais de *Rana esculenta*, comparé au cercle dépoli.

A-B, empoisonnement à l'intérieur de la cuvette par du Ringer phosphaté + acide iodacétique 1 : 25.000. La solution de poison a été renouvelée au bout d'une demi-heure, puis remplacée par du Ringer phosphaté pur au bout d'une heure.

B-C, 5 excitations jusqu'à l'adaptation définitive du muscle.

C-D, excitations portées jusqu'à la rigidité complète, 30 excitations par minute, chocs maxima d'ouverture, 8 volts.

ci-contre, l'extinction va décroissant jusqu'à l'établissement de la rigidité.

Ici également, le résultat devient encore plus frappant quand on fait travailler le muscle dans de l'huile de paraffine au lieu

de la solution de Ringer, afin d'empêcher l'imbibition par l'eau. Dès lors, l'obscurcissement causé par la formation d'acide lactique fait entièrement défaut, étant donné qu'il n'était dû qu'à une imbibition secondaire, ainsi qu'il résulte de l'étude des témoins. On peut alors suivre les transformations de l'acide

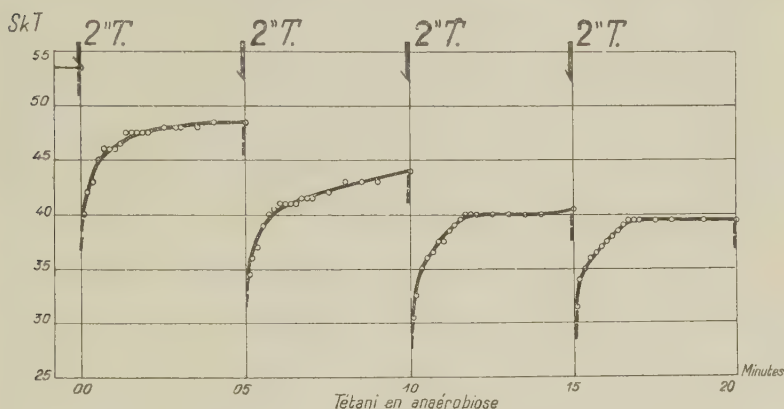


FIG. 23.

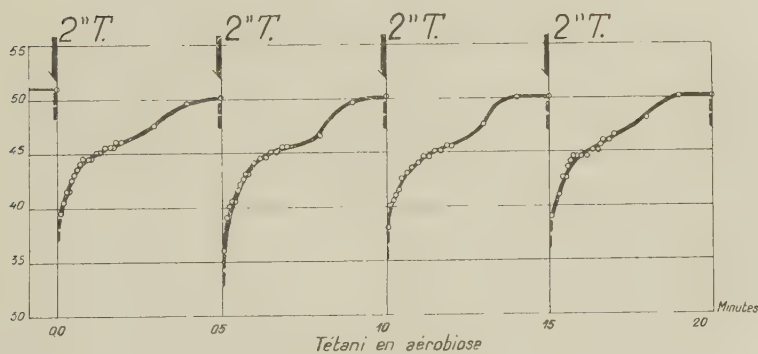


FIG. 24.

FIG. 23 et 24. — Tracés découpés dans une série de tétanos de deux secondes en anaérobiose (fig. 23) et en aérobiose (fig. 24). Ordonnée, variation du galvanomètre correspondant au courant photoélectrique. Diminution de la variation, diminution de l'extinction, augmentation du courant photoélectrique. Abscisse, temps en minutes. Intervalles de cinq minutes entre deux excitations.

créatine-phosphorique seul dans une série de tétanos et de secousses isolées, sans que la formation d'acide lactique inter-

vienne en même temps dans l'observation. Tandis que, jusqu'à présent, cette méthode n'avait pu servir à montrer ce qui se passe au moment de la contraction, elle montre maintenant le clivage et la resynthèse de l'acide créatine-phosphorique avec plus de précision encore peut-être que ne le fait la méthode volumétrique. Vous voyez sur la figure 23 ce qui se passe pendant 4 *tétanos* anaérobies consécutifs de deux secondes chacun. Dès la fin du *tétanos*, il y a tout de suite un fort éclaircissement dû à la décomposition de l'acide créatine-phosphorique. Cet éclaircissement est réduit, dans le délai d'une minute, de $2/3$. Les distances des *tétanos* particuliers sont de cinq minutes, et l'on voit que dans l'intervalle un autre niveau s'établit (fig. 24).

La rétrocession correspond à la resynthèse, le niveau récent indique le bilan de la décomposition par rapport à l'état initial. Ceci se répète lors de chaque *tétanos* suivant, mais les écarts diminuent, c'est-à-dire la resynthèse devient de plus en plus complète. La figure 24 montre aussi le même phénomène, mais en atmosphère d'oxygène. On voit de nouveau ce que nous avons appris déjà par les dosages chimiques, à savoir qu'en présence d'oxygène la resynthèse anaérobie rapide est suivie d'une resynthèse aérobie lente. En deux minutes, en présence d'oxygène, l'acide créatine-phosphorique est complètement resynthétisé jusqu'à la concentration de départ, de façon que la transparence atteint le niveau initial.

Il ne faut pas méconnaître que toutes ces méthodes physiques, si utiles qu'elles puissent être pour suivre les changements chimiques, ne nous donnent pas de renseignement sur le mécanisme même de la contraction. Je veux cependant signaler encore très brièvement une méthode qui permet de pénétrer ce mécanisme, sans toutefois établir jusqu'à présent le rapport direct avec les données chimiques. C'est la méthode d'enregistrement de la double réfraction, également mise au point par A. von Muralt. La variation négative de la double réfraction des parties anisotropes des fibrilles musculaires a été découverte, comme on le sait, par Ebner, Rollet et d'autres il y a plus de cinquante ans. Mais c'est A. von Muralt qui, le premier, a réussi à l'enregistrer quantitativement par rapport à la contraction. Ne pouvant m'arrêter sur sa méthode, je me conten-

terai de reproduire un décalque d'une photographie originale (fig. 25).

En haut, c'est le tracé de la secousse isométrique sur lequel on a marqué le temps au moyen d'un diapason par des repères de $1/500$ de seconde. En bas, on a tracé le déplacement des raies dites de Fizeau-Foucault pour deux longueurs d'onde différentes; le déplacement correspond au changement de la double réfraction; ce déplacement a lieu vers les ondes courtes du spectre. Vous voyez alors que ce n'est pas uniquement au moment de l'accroissement de la tension qu'il y a une variation, mais qu'il y en a une aussi lors de la décontraction. Ceci correspond exactement

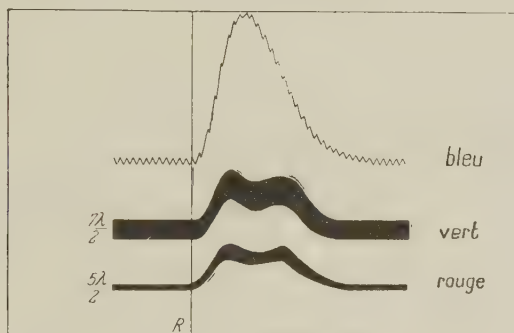


FIG. 25. — Secousse singulière isométrique d'un muscle légèrement fatigué. Ordonnée, diminution de la différence de marche (accroissement de la tension); abscisse, temps; R, moment de l'excitation.

à la distinction établie par Hartree et Hill dans la chaleur anaérobie initiale de la contraction, en chaleur de tension et chaleur de décontraction. Sans entrer dans le détail de la théorie, je veux signaler qu'un changement de la double réfraction doit correspondre à un changement de forme ou de tension des micelles de protéines dans les segments anisotropes. Ce changement de forme des micelles des protéines est finalement à la base de la contraction. Mais la question de savoir comment ce changement est provoqué, soit par une variation de l'ionisation des protéines, soit par une autre voie, ne peut être abordée aujourd'hui. On ne peut savoir non plus si ce changement n'est pas provoqué directement par la séparation de l'acide phosphorique des composés dont nous venons de parler. Ceci est

une tâche pour l'avenir. Je n'ai voulu que vous indiquer comment nous nous approchons par différentes voies de la solution du problème de la contraction musculaire, en établissant le rapport entre les processus chimiques et une série de phénomènes physiques jusqu'ici inconnus.

BIBLIOGRAPHIE

- Pour les anciens travaux, consulter O. MEYERHOF. *Chimie de la contraction musculaire*, Bordeaux et Paris, 1932.
- LIPMANN, F. u. O. MEYERHOF, Ueber die Reaktionsänderung des tätigen Muskels. *Biochemische Zeitschrift*, **227**, 1930, p. 84.
- MEYERHOF, O. W. MÖHLE, u. W. SCHULZ, Ueber die Reaktionsänderung des Muskels im Zusammenhang mit Spannungsentwicklung und chemischem Umsatz. *Biochemische Zeitschrift*, **246**, 1932, p. 285.
- V. MURALT (A.), Ueber das Verhalten der Doppelbrechung des quergestreiften Muskels während der Kontraktion. *Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, **230**, 1932, p. 299.
- MEYERHOF, O. u. W. MÖHLE, Ueber die Volumenschwankung des Muskels in Zusammenhang mit dem Chemismus der Kontraktion. *Biochemische Zeitschrift*, **260**, 1933, p. 451 : I. Mitteilung, Methoden. **260**, 1933, p. 469 ; II. Mitteilung, Die Volumenschwankung bei verschiedenen Kontraktionsformen, **261**, 1933, p. 252; III. Ueber die Volumenänderung bei chemischen Vorgängen im Muskel.
- V. BAEYER (E.), Lichtdurchlässigkeit und Tätigkeitsstoffwechsel des Muskels. *Klinische Wochenschrift*, **1933**, p. 1278.
- V. BAEYER, E. u. A. V. MURALT, Lichtdurchlässigkeit und Tätigkeitsstoffwechsel des Muskels. *Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, **234**, 1934, p. 233.
- V. MURALT (A.), Lichtdurchlässigkeit und Tätigkeitsstoffwechsel des Muskels. II. Mitteilung. *Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, **234**, 1934, p. 233.
- HARTMANN (H.), Die Änderungen des Muskelvolumens bei der tetanischen Kontraktion als Ausdruck der chemischen Vorgänge im Muskel. *Biochemische Zeitschrift*, **270**, 1934, p. 164.
- LOHMANN (K.), Ueber den Chemismus der Muskelkontraktion. *Naturwissenschaften*, **22**, 1934, p. 409.

ÉTUDES SUR LES ANTIGÈNES FIXATEURS DES BACILLES TUBERCULEUX

(PREMIER MÉMOIRE)

ANTIGÈNES FIXATEURS CONTENUS DANS LES SUBSTANCES LIPOÏDIQUES EXTRAITES DE BACILLES TUÉS PAR LA CHALEUR

par MICHEL A. MACHEBOEUF et GEORGETTE LÉVY
avec la collaboration de M. CHAMBAZ.

Much (1), Kurt Meyer (2), Besredka (3), Pétroff (4), Boquet et Nègre (5), Dienes (6), ont montré qu'il était possible d'obtenir à partir du bacille tuberculeux des extraits capables de fixer l'alexine en présence de sérums d'animaux ou d'hommes tuberculeux.

Les extraits préparés par ces divers auteurs sont des mélanges complexes et aucun essai de purification n'a été tenté pour isoler leurs substances actives. Dans un précédent travail que nous avons rapporté ici même (7), nous avons extrait, puis fractionné les substances lipoidiques des corps bacillaires. Dans le travail rapporté aujourd'hui, nous avons cherché à savoir tout d'abord quelles étaient celles de ces diverses fractions lipidiques qui possédaient des propriétés fixatrices, puis nous avons cherché à purifier les substances actives contenues dans ces fractions.

Nos buts étaient divers : 1° Isoler ou tout au moins purifier

(1) MUCH. *Beitr. z. Klin. der Tuberk.*, 20, 1911, p. 341.

(2) MEYER (K.). *Zeits. F. Immunit.*, 14, 1912, p. 359 et 15, 1913, p. 245.

(3) BESREDKA. *Ann. Institut Pasteur*, 35, 1921, p. 291.

(4) PETROFF (S. A.). *Amer. Rev. of Tuberculosis*, 1, 1917, p. 33, 2, 1918, p. 523 et 2, 1919, p. 717.

(5) BOQUET (A.) et NÈGRE (L.). *C. R. Soc. Biol.*, 83, 1920, p. 922 et 960, 87, 1922, p. 1162 et *Ann. Inst. Pasteur*, 37, 1923, p. 787.

(6) DIENES (L.). *Journ. of Immunol.*, 17, 1929, p. 85, 157 et 173.

(7) MACHEBOEUF (M.-A.), LÉVY (G.) et FETHKÉ (N.) avec DIÉRYCK (J.) et BONNEFOI (A.). *Ann. Institut Pasteur*, 52, 1934, p. 277 et *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 16, 1934, p. 353.

assez les substances actives pour pouvoir nous renseigner sur leur nature chimique ; 2° Savoir si le pouvoir haptène appartenait à une seule substance ou à un ensemble de substances voisines ou, au contraire, à une série de substances lipoïdiques diverses ; 3° Nous espérons au moins débarrasser les substances actives de la majeure partie des substances inertes ou tuberculiniques qui les accompagnent dans les extraits complexes préparés jusqu'ici.

L'antigène de Petroff est un simple extrait méthylique de corps bacillaires tués par la chaleur. Les substances extraites par l'alcool méthylique sont très diverses, l'extrait de Petroff est donc un mélange très complexe qui s'émulsionne mal dans l'eau et qui présente un pouvoir empêchant de l'hémolyse assez élevé.

L'antigène de Boquet et Nègre est très supérieur à tous points de vue à celui de Petroff, il ne contient pas une aussi grande quantité de substances lipidiques inactives s'émulsionnant mal dans l'eau ; son pouvoir empêchant est encore notable, mais disparaît en présence de sérum en quantité convenable. De plus, l'antigène de Boquet et Nègre a conduit à des résultats thérapeutiques fort intéressants.

Nous avons accessoirement cherché si, par purification des substances actives, nous pouvions atténuer ou faire disparaître le pouvoir empêchant pour l'hémolyse et éventuellement supprimer les substances qui peuvent provoquer une réaction fébrile chez quelques-uns des tuberculeux traités.

L'antigène de Nègre et Boquet se prépare à partir de bacilles tués par la chaleur, puis séchés. Ces corps bacillaires sont partiellement dégraissés par macération dans l'acétone ; cette opération élimine une partie des lipides dont l'activité haptène est à peu près nulle. On met enfin les bacilles à macérer dans de l'alcool méthylique et la solution méthylique filtrée est l'« antigène » de Nègre et Boquet ; sa concentration est telle que 1 cent. cube correspond à 1 centigramme de bacilles secs. Par addition progressive d'eau à cette solution alcoolique, on obtient des émulsions fines et assez stables.

L'antigène à l'œuf de Besredka est une émulsion aqueuse de bacilles cultivés sur un milieu spécial à l'œuf, puis stérilisés par la chaleur. L'antigène de Besredka est un bon antigène

pour les réactions de fixation, mais c'est un mélange bien plus complexe encore que les extraits de Pétroff ou de Boquet et Nègre et son pouvoir fixateur peut ne pas dépendre des seuls principes immédiats lipidiques du bacille.

Techniques utilisées.

SOLUTIONS ANTIGÉNIQUES SERVANT D'ÉTALONS DE COMPARAISON.

Nous nous sommes parfois servis de l'antigène de Besredka comme terme de comparaison accessoire au cours de nos déterminations des activités fixatrices de nos fractions lipidiques, mais nous avons toujours rapporté nos résultats à un étalon arbitraire constitué par une préparation donnée d'antigène méthylique. L'échantillon, tel qu'il nous avait été aimablement remis par nos collègues Boquet et Nègre, contenait, après filtration et élimination de quelques flocons insolubles, 0 milligr. 77 de substances dissoutes par centimètre cube. Nous avons dilué cette solution par de l'alcool méthylique de telle manière que 1 cent. cube contienne exactement 0 milligr. 50 de substances dissoutes. Nous avons conservé cette solution étalon à froid et à l'abri de l'air et de la lumière, elle nous a servi à préparer, pour chaque expérience, par dilution au moyen d'eau physiologique, les émulsions dont nous avons comparé l'activité fixatrice à toutes les émulsions des fractions lipidiques bacillaires que nous avons étudiées.

MISE EN SUSPENSION AQUEUSE DES FRACTIONS ÉTUDIÉES.

Lorsque cela fut possible, nous avons toujours préparé avec les fractions étudiées une solution-mère dans l'alcool méthylique dont la concentration était aussi de 0 milligr. 5 par centimètre cube, et ce sont les émulsions aqueuses, obtenues en diluant lentement ces solutions avec de l'eau, dont nous avons comparé les pouvoirs fixateurs entre eux et à celui de l'antigène de Nègre et Boquet utilisé comme étalon.

Pour quelques fractions, la solubilité dans l'alcool méthylique était trop faible pour qu'il fût possible de préparer une

solution à 0 milligr. 5 par centimètre cube; nous avons alors préparé, au moyen d'un autre solvant volatil, une émulsion aqueuse à 0 milligr. 1 par centimètre cube, puis éliminé par distillation partielle dans le vide le solvant utilisé, et nous avons enfin ramené au volume primitif en ajoutant de l'eau et aussi de l'alcool méthylique en quantité convenable pour que la teneur en cet alcool soit la même que si l'émulsion aqueuse à 0 milligr. 1 par centimètre cube avait été préparée, comme d'habitude, en diluant au $1/5$ par de l'eau physiologique une solution méthylique à 0 milligr. 5 par centimètre cube.

Pour quelques rares fractions enfin, il nous a été impossible d'obtenir des émulsions aqueuses suffisamment fines et stables; nous n'avons donc pas pu étudier avec précision leur pouvoir fixateur.

Titrages. Nous avons utilisé la méthode classique des doses décroissantes d'haptène en laissant fixes les doses d'alexine et d'anticorps. Toutes nos fractions ont été titrées au moyen d'un même sérum de cheval préparé par des injections de bacilles vivants de la souche BCG. Nous avons effectué, en outre (1), quelques expériences avec des sérums d'animaux ou d'hommes tuberculeux.

Nous avons toujours fixé la dose d'alexine à 2,5 doses minima actives et le volume total dans chaque tube d'hémolyse était 2 c. c. contenant 0 c. c. 25 d'une émulsion de globules rouges de mouton correspondant à du sang dilué au $1/20$.

Résultats expérimentaux.

COMPARAISON DES ACTIVITÉS FIXATRICES DE TOUTES LES FRACTIONS LIPIDIQUES PRIMORDIALES.

Dans le tableau ci-contre, nous avons rassemblé les résultats obtenus en déterminant l'activité de chacune des fractions primordiales obtenues par la méthode indiquée dans un précédent mémoire (*loc. cit.*). Nous renvoyons à ce mémoire pour la défi-

(1) Avec l'aide amicale et éclairée de C. Ninni; nous tenons en outre à remercier ici M. W. Schaeffer, qui a bien voulu effectuer pour nous quelques titrages qui ont confirmé les nôtres.

nition précise de chacune des fractions en nous contentant de rappeler ici pour chacune d'elles, en quelques mots, le principe de la technique qui nous a conduit à l'obtenir. Nous avons fixé à 100 l'activité de notre échantillon étalon d'antigène méthylique de Nègre et Boquet, et si nous indiquons pour une fraction une activité de 150, par exemple, cela signifie que, à poids égal, la fraction est plus active que les substances de l'extrait méthylique de Boquet-Nègre, et que pour fixer complètement une même dose d'alexine, toutes conditions égales d'ailleurs, il faut 1.5 fois moins de la fraction considérée que des substances de Boquet et Nègre.

Activité fixatrice des diverses fractions lipidiques primordiales.

Étalon. — Activité de l'extrait méthylique de Boquet et Nègre fixé arbitrairement à 100. 100

Fraction A (extrait total par l'acétone froid). 5

Fraction B (extraite par l'alcool chaud et restant soluble dans l'alcool froid).

Cette fraction est subdivisée en trois sous-fractions :

Sous-fraction B₁ : très peu soluble dans l'éther 0

Sous-fraction B₂ : soluble dans l'éther et insoluble dans l'acétone. 333

Sous-fraction B₃ : soluble dans l'éther et l'acétone 8

Fraction C (extraite par l'alcool chaud, mais précipitant par refroidissement de l'alcool).

Cette fraction est subdivisée en quatre sous-fractions :

Sous-fraction C₁ : très peu soluble dans l'alcool chaud 0

Sous-fraction C₂ : soluble dans l'alcool chaud et très peu soluble dans l'alcool froid. 0

Sous-fraction C₃ : soluble dans l'alcool chaud et très peu soluble dans l'alcool froid. 2

Sous-fraction C₄ : soluble dans l'alcool froid; cette fraction est donc une partie de la fraction B entraînée par la fraction C . 150

Fractions D et E. — Il est impossible de préparer au moyen de ces fractions des émulsions fines et stables dans l'eau, les émulsions grossières que nous avons pu obtenir n'ont pas présenté de pouvoir fixateur appréciable.

Ces premiers résultats nous permettent déjà de conclure que seules sont actives les fractions solubles dans l'alcool froid et extrêmement peu solubles dans l'acétone, Bien plus, c'est uniquement dans les fractions B₂ et C₄ qu'il existe une activité fixatrice notable, mais C₄, soluble dans l'alcool froid, n'est en

somme qu'un peu de B qui souillait la fraction C. Dans C_4 comme dans B, les substances actives sont précipitables par l'acétone et les caractères physiques et chimiques des substances actives de C_4 , ainsi séparées par l'acétone, permettent de les considérer comme identiques à B_2 .

Les fractions A_1 , B_3 et C_3 qui présentaient un pouvoir fixateur très faible, mais encore net, ont été fractionnées par l'acétone, et nous avons constaté que leur activité était également due à la présence de petites quantités d'impuretés phosphorées très peu solubles dans l'acétone, solubles dans l'alcool froid et analogues à B_4 .

Il est donc permis de conclure que, parmi toutes les substances lipoidiques du bacille tuberculeux, un seul type de substances possède un pouvoir fixateur appréciable : substances solubles dans l'alcool froid, extrêmement peu solubles dans l'acétone. De plus, aucune sous-fraction ne s'est montrée active sans contenir du phosphore et une forte activité s'accompagnait toujours d'une forte teneur en phosphore. Quelques fractions, par contre, bien que très riches en phosphore, sont absolument inactives (B_1 , par exemple).

ESSAIS DE PURIFICATION

DE LA FRACTION PRIMORDIALE LA PLUS ACTIVE B_2 .

L'ensemble des résultats rapportés ci-dessus nous avait amenés à penser que l'activité fixatrice appartenait à des phosphatides ; nous avons donc cherché à purifier notre fraction si active B_2 par précipitations répétées au moyen d'acétone à partir d'une solution chloroformique concentrée. Par cette méthode, nous avons vu s'élever progressivement et parallèlement l'activité et la teneur en phosphore des précipités successifs. Après sept précipitations successives, la teneur en phosphore et l'activité sont restées constantes ; l'activité était alors 440, la fraction obtenue était donc 4,4 fois plus active, à poids égal, que l'extrait méthylique de Boquel et Nègre. La fraction B_2 brute contenait 3,35 p. 100 de phosphore, mais, après sept précipitations successives par l'acétone, la teneur en phosphore a atteint la limite de 4,9 p. 100.

La substance obtenue n'est pas une lécithine ni une céphaline, ni un phosphoglycéride, car elle ne donne pas de glycérol

par saponification alcaline. La teneur en azote est d'ailleurs faible et voisine de 1,3 p. 100, tandis que la teneur en phosphore est très supérieure à celle des lécithines.

Nous avons constaté que la substance si active obtenue ici n'est encore qu'un mélange, car, par fractionnement au moyen d'alcool, nous avons pu obtenir des fractions dont les points de fusion et les teneurs en phosphore diffèrent, mais pour poursuivre l'isolement de la substance active il nous fallait de grandes quantités de matière première que nous préparons actuellement.

Quoi qu'il en soit, les essais que nous rapportons ici nous permettent déjà de conclure ainsi :

Résumé et conclusions.

Parmi les nombreuses fractions lipoïdiques extraites des bacilles, puis séparées suivant la méthode indiquée dans un mémoire précédent (7), deux fractions seulement présentent à un degré notable la propriété de fixer l'alexine en présence de sérums de tuberculeux. Ces deux fractions ont été fractionnées méthodiquement, et il a été possible d'attribuer la totalité de leur activité à une même sous-fraction active commune. La fraction active ainsi séparée n'est pas encore une substance pure ; son activité est cependant considérable et se montre, à poids égal, près de cinq fois supérieure à celle des substances déjà si actives contenues dans l'extrait méthylique de Boquet et Nègre.

La fraction active est très soluble dans le chloroforme, assez soluble à froid dans l'alcool et extrêmement peu soluble dans l'acétone. Sa teneur en phosphore est très élevée (5 p. 100 environ). Aucune fraction non phosphorée ne s'est montrée active, mais certaines fractions riches en phosphore sont inactives. Tous ces faits tendent à rapprocher la (ou les) substances actives des phosphatides, mais leur saponification ne libère aucune trace de glycérol. Les fractions obtenues sont si actives que 1/1.000 de milligramme suffit pour fixer deux doses minima d'alexine.

HISTO-CYTOLOGIE DES RÉACTIONS LOCALES D'HYPERSENSIBILITÉ CHEZ LE COBAYE (RÉACTIONS ALLERGIQUES A LA TUBERCULINE ET RÉACTIONS ANAPHYLACTIQUES)

par R. LAPORTE.

(*Institut Pasteur.*
Laboratoire de recherches sur la tuberculose.)

Dans le cadre général de l'inflammation, il est un ordre particulier de réactions des animaux préparés aux réinjections intratissulaires de protéine sensibilisante, qui constitue un type d'inflammation aseptique dont il convient de définir les caractères. Ces réactions locales d'hypersensibilité se présentent sous un double aspect : *la réaction allergique*, du type tuberculinique, d'une part; *la réaction anaphylactique*, d'autre part.

Dans quelle mesure la réaction allergique de la peau à la tuberculine constitue-t-elle un type particulier d'inflammation spécifique? Au point de vue histologique, c'est là un problème important, car on peut penser que l'injection intradermique de tuberculine à des animaux tuberculeux provoque seulement une inflammation banale dont la spécificité tiendrait uniquement à ce qu'elle ne se produit que chez les sujets porteurs de lésions tuberculeuses. S'il existait, au contraire, des phénomènes inflammatoires propres à la réaction allergique, leur connaissance serait capitale pour l'étude de son mécanisme.

Les premières recherches entreprises sur l'histologie des dermo-réactions tuberculiniques ont été faites par Auché et Augistrou, et par Spehl, sur des animaux fortement tuberculisés par une injection massive de crachats ou de cultures de bacilles humains virulents. L'injection intradermique d'une goutte de tuberculine brute, non diluée, ou seulement diluée de moitié, a produit naturellement une escarre importante. Aussi les auteurs ont-ils insisté particulièrement sur les réac-

tions de nécrose et ont-ils été frappés par la prédominance quasi exclusive des polynucléaires parmi les cellules émigrées. Ils ont observé l'infiltration diffuse de tout l'épiderme par les polynucléaires, migration s'exagérant par places pour former des bandes et des foyers. Beaucoup de cellules épidermiques subissent l'altération vacuolaire. Le derme, surtout au niveau de la couche papillaire, le tissu cellulaire sous-cutané et les faisceaux musculaires striés de la peau sont infiltrés aussi par un très grand nombre de polynucléaires souvent déformés et en voie de destruction. Ces lésions s'accroissent pendant le second jour; plus tard, le nombre des leucocytes diminue, les fragments nucléaires disparaissent, les cellules du tissu conjonctif s'hyperplasient. On voit arriver des cellules d'un nouvel ordre : lymphocytes, leucocytes mononucléaires. Auché et Augistrou ont noté, en outre, l'importance des phénomènes d'ectasie vasculaire et d'infiltration des tissus par les globules rouges.

Pour Bessau, la réaction tuberculinique n'est rien de plus, après quelques jours, qu'un foyer tuberculeux néo-formé. Des caractères biologiques complètent cette identité histologique; c'est ainsi que la réaction dite de reviviscence ne serait qu'une simple réaction focale. La réaction allergique ne traduirait donc que la capacité de l'organisme de produire du tissu tuberculeux sous l'influence de l'injection spécifique. Cette opinion a été reprise par Zieler, pour qui l'injection intracutanée de tuberculine donne du tissu tuberculeux trois semaines après. Le même auteur a vu cependant que des suspensions de certains germes tués, le colibacille par exemple, sont susceptibles, quand on les injecte dans la peau, d'entraîner la formation d'amas de cellules épithélioïdes et de cellules rondes dans le tissu conjonctif périvasculaire, mais aussi bien chez les sujets sains que chez les tuberculeux. Il conclut, comme Bessau, que la réaction tuberculinique est spécifique en ce sens que l'organisme ayant reçu des bacilles de Koch est seul capable d'édifier du tissu tuberculeux sous l'effet de l'injection de substances extraites de ces bacilles.

Ces conclusions ont été combattues par Selter et ses élèves. On trouvera dans l'article de Blumenberg, dont nous donnons la référence, une revue bibliographique très complète de tous

les travaux cliniques et anatomiques qui tendent à réfuter l'hypothèse de la spécificité de la réaction tuberculinique. D'après ces auteurs, le sujet sain réagirait aussi à l'injection de tuberculine par la production de tissu tuberculeux. On pourrait obtenir, d'ailleurs, la formation de ce tissu par l'injection de vaccins microbiens et même de filtrat de culture de colibacilles. Blumenberg a observé chez un homme l'apparition de tissu tuberculeux quinze jours après une injection intradermique d'eau distillée. La réaction tuberculinique du sujet tuberculeux ne serait donc que l'exagération d'une réaction inflammatoire simple. Ces conclusions, opposées à celles de Bessau et de Zieler, montrent que l'accord n'a pu se faire entre les anatomo-pathologistes sur la spécificité de l'inflammation allergique, au moins par l'étude des modifications tardives qu'elle entraîne dans les tissus.

Récemment, Dienes et Mallory ont repris l'étude des réactions tuberculiques. Ils ont cherché à identifier ce type de réaction du point de vue anatomique, comme Zinsser l'avait fait du point de vue clinique. On sait que Zinsser a opposé le type anaphylactique des réactions cutanées d'hypersensibilité où l'inflammation est immédiate et transitoire, au type tuberculinique où la réaction est retardée et prolongée. L'état allergique, au contraire de l'état anaphylactique, ne s'accompagne pas d'anticorps décelables dans le sérum sanguin; la transmission passive d'un sujet sensible à un sujet sain est donc impossible. Chez les sujets allergiques, l'injection intraveineuse de l'antigène n'entraîne pas de choc immédiat et mortel, mais des troubles pathologiques tardifs. Pour l'étude histologique, Dienes et Mallory insistent sur la nécessité de prendre comme type les réactions tuberculiques modérées ou faibles, afin de faire la part de ce qui revient à la réaction due à la nécrose. Ils ont noté que l'infiltration cellulaire est alors à prédominance mononucléaire, surtout au début de la réaction jusqu'à la sixième heure et aux stades tardifs après la quarante-huitième heure. Pendant la période intermédiaire, de la septième à la quarante-huitième heure, la proportion des polynucléaires augmente, mais ils prédominent rarement. C'est au cours de cette période que des signes de dégénérescence et de nécrose de l'épiderme apparaissent. Dans les réactions faibles, où la

nécrose épidermique ne survient pas, l'infiltration inflammatoire est presque exclusivement formée de mononucléaires. Tel serait le tableau histologique caractéristique du type d'hypersensibilité dit « tuberculinique ».

Par l'intensité des phénomènes exsudatifs, la prédominance des polynucléaires qui est de règle pendant toute la durée de la réaction, les réponses anaphylactiques s'opposeraient à ce type.

Il semble résulter de ces recherches de Dienes et Mallory que les caractères histologiques spécifiques des réactions d'allergie cutanée doivent être recherchés pendant la période d'apparition et de développement de la réaction, et non au stade ultime du processus inflammatoire.

Dans ce mémoire, nous reprendrons l'étude des divers aspects de la réaction du derme à la tuberculine chez le cobaye, des modalités de son évolution en fonction du temps et de ses variations suivant l'intensité de la sensibilité du sujet. En la comparant aux réactions inflammatoires simples, ainsi qu'aux réactions cutanées du type anaphylactique, nous essayerons de préciser quels sont les caractères qui lui sont spécifiques.

1. — Technique expérimentale et histologique.

Nos recherches ont porté sur de nombreuses coupes de réactions tuberculiniques du derme obtenues chez des cobayes de pelage blanc et en bon état, infectés par des bacilles tuberculeux virulents, ou par des bacilles peu pathogènes (souche R_1), ou par du BCG. Nous avons employé, pour l'étude des réactions faibles, des cobayes sensibilisés depuis trois semaines environ par des bacilles de souche R_1 , ou par du BCG. Les épreuves ont été faites par injection intradermique, au niveau des flancs, de 0 c. c. 1 d'une solution de tuberculine brute, diluée de 1 p. 10 à 1 p. 100. Dans certaines expériences, nous avons employé au lieu de tuberculine le filtrat sur bougie Chamberland L_2 de cultures de bacilles bovins (Vallée) en milieu de Sauton, âgées de cinq semaines, suivant la technique de A. Boquet et J. Bretey.

Les pièces ont été prélevées par biopsie et fixées tantôt pen-

dant sept heures dans le liquide de Helly, ce qui durcit un peu trop la peau, tantôt pendant huit jours dans une solution rigoureusement neutre et isotonique de formol à 5 p. 100, puis pendant douze heures dans le picro-formol de Duboscq-Brasil. Cette dernière méthode assure une conservation parfaite des hématies et une excellente fixation des noyaux et des cytoplasmes; elle permet toutes les colorations. Les coupes de 2μ 5 à 5μ ont été effectuées en partant du foyer central de la réaction; elles ont été colorées par la méthode de l'hémalun avec contre-coloration à l'érythrosine-orange.

Nous avons aussi employé la méthode de May Grünwald-Giemsa, l'hématoxyline ferrique de Heidenhain, l'érythrosine orange-bleu de toluidine et accessoirement la coloration de Weigert pour la fibrine, celle de Van Gieson ou celle de Masson au bleu d'aniline pour le tissu collagène.

II. — Étude histologique des réactions tuberculiques.

Au cours des deux premières heures qui suivent l'intradermo-tuberculation, des phénomènes exsudatifs et congestifs intenses apparaissent dans le territoire injecté, se traduisant, en général, par une réaction macroscopique. Un œdème important distend les faisceaux dermiques; il est surtout abondant dans l'hypoderme, où il dissocie les fibres collagènes lâches en une fine dentelle qu'envahissent des cellules dont le nombre augmente très vite. Il s'agit surtout de polynucléaires parfaitement intacts, d'éosinophiles et de monocytes plus rares. Cette infiltration atteint la couche musculaire striée de la peau et l'hypoderme situé en dessous. Traduisant une vive congestion, les vaisseaux apparaissent dilatés et gorgés d'hématies.

Déjà après *un quart d'heure*, on observe des images de margination et de diapédèse intense des polynucléaires qui forment dans le derme des petits nodules très denses, presque toujours centrés par un capillaire ou entourant un follicule pileux inhabité. On trouve néanmoins plus de monocytes qu'à l'état normal; ils apparaissent épars, surtout dans la couche papillaire du derme où ils dominent; parfois ils sont groupés en

petits amas de 5 à 6. Il existe, en outre, un appel très net des éosinophiles dans les capillaires, aussi bien dermiques qu'hypodermiques. On trouve aussi ces éléments parmi les nombreuses cellules qui se pressent autour des vaisseaux congestionnés : capillaires et veines.

Après *une heure*, l'infiltration cellulaire est plus étendue et plus diffuse, l'œdème a diminué, mais les phénomènes vasodilatateurs persistent avec margination et diapédèse intense des leucocytes. Ces phénomènes congestifs sont surtout évidents dans les couches profondes, car il n'est pas rare de trouver dans le derme de nombreux capillaires écrasés et exsangues. A ce stade, les phénomènes de réaction conjonctive s'ébauchent déjà, on trouve d'assez nombreux grands fibroblastes, fortement basophiles, de forme triangulaire ou polygonale, à gros noyau souvent bourgeonnant et sans membrane nette, clair, d'aspect spongoïde, avec quelques petits blocs de chromatine. Le cytoplasme de ces cellules est finement granuleux.

Vers la *troisième heure*, l'aspect de l'inflammation change, l'œdème et la congestion vasculaire ont diminué et sont très réduits, mais l'émigration cellulaire s'est beaucoup accrue. Dans les réactions très fortes, qui deviendraient nécrotiques, les polynucléaires se montrent extrêmement nombreux à ce stade, formant des amas dermiques qui envoient des prolongements épais entre les faisceaux conjonctifs. Au centre de la réaction, on voit une bande sous-épidermique d'infiltration à polynucléaires, mais il n'existe pas encore, en général, de lésions apparentes de l'épiderme. Dans l'hypoderme, les polynucléaires dominent également, formant une nappe d'infiltration diffuse. A ce stade cependant, l'afflux monocytique s'accroît beaucoup, surtout dans l'intérieur et autour des vaisseaux. Dienes et Mallory ont déjà insisté sur l'importance des monocytes dans les réactions de la deuxième heure.

Sur les coupes des prélèvements faits après *5 heures, 7 heures, 9 heures*, on voit s'accroître les phénomènes précédents : dans le derme, le nombre de polynucléaires augmente encore, surtout dans les réactions fortes. Vers la cinquième heure, on voit réapparaître l'œdème et la congestion, on constate l'existence de signes d'altération vasculaire que nous décrirons plus loin.

Vers la *huitième heure*, parfois plus tôt, les premières lésions

nettes de l'épiderme se manifestent. C'est là l'apanage exclusif des réactions fortes, mais ces altérations sont parfois tardives dans les réactions moins intenses. Elles consistent en infiltrations de la couche moyenne du corps muqueux par des polynucléaires isolés ou groupés en îlots, blocs ou bandes. En même temps, des signes de dégénérescence vacuolaire avec pycnose nucléaire frappent de nombreuses cellules épidermiques, réalisant un véritable état spongoïde, et l'infiltration du derme par les polynucléaires s'accroît, en particulier au niveau de la zone papillaire. Cette infiltration massive du derme serait en rapport étroit, d'après Dienes, avec les phénomènes de nécrose épidermique. Pour cet auteur, les altérations de l'épiderme dans la réaction cutanée à la tuberculine traduisent un état de sensibilisation des cellules épithéliales elles-mêmes; on assisterait à des phénomènes analogues à ceux que de nombreux auteurs ont décrits au sujet de la sensibilisation épidermique envers certains médicaments. Naegeli aurait obtenu une véritable destruction de lambeaux épidermiques placés dans une solution d'antipyrine et prélevés sur un homme au niveau de certains territoires cutanés qui présentaient un érythème à chaque absorption d'antipyrine par le sujet. D'autres fragments, placés dans les mêmes conditions mais prélevés dans des territoires non sensibles, auraient conservé, par contre, une structure normale. Pour Dienes, il n'y a pas de relation [directe entre la nécrose de la peau et le degré d'hypersensibilité générale. La nécrose serait la conséquence de la sensibilité propre de l'épiderme et c'est à elle que serait due la prédominance de l'infiltration par des polynucléaires des couches dermiques superficielles et de l'épiderme. Il n'est pas douteux, en effet, que toutes les fois qu'une réaction tuberculinique évolue vers la nécrose, l'atteinte de l'épiderme soit de règle; mais ce n'est pas toujours en regard des zones d'altération maxima de l'épiderme que l'afflux le plus intense de polynucléaires se produit dans le derme. Il se peut que l'épiderme soit vraiment sensibilisé à la tuberculine, mais rien n'autorise à contester une sensibilité propre des tissus dermiques eux-mêmes.

Entre la *vingt-quatrième* et la *trentième* heure, les réactions atteignent leur acmé. Les différences sont alors très accentuées entre les réactions fortes et les réactions faibles non nécrotiques.

Dans les *réactions fortes*, toute la couche moyenne du corps muqueux, puis l'assise basale sont détruites, et les infiltrats inflammatoires confluent. La nécrose frappe l'épiderme et une zone dermique en général étroite. Dans les *réactions très fortes*, les altérations nécrotiques pénètrent en profondeur dans le derme et prennent un type hémorragique. Souvent quelques follicules pileux échappent à la nécrose et restent intacts au milieu

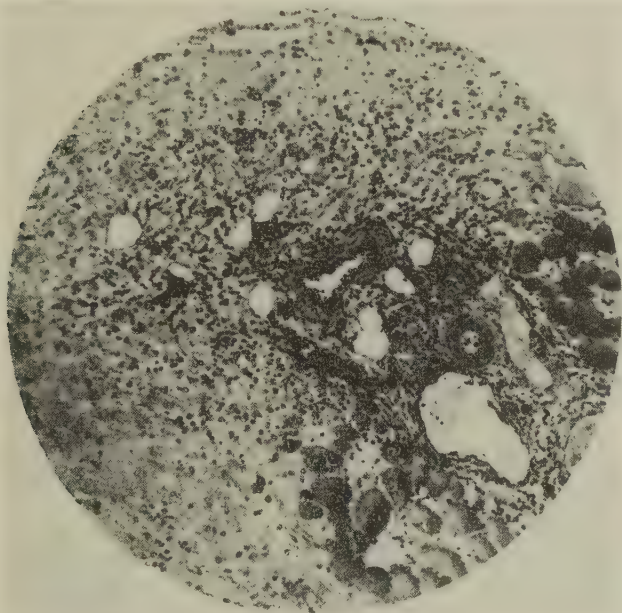


FIG. 1. — *Réaction tuberculinique forte de trente heures.*
Foyers d'infiltration à monocytes autour des gros vaisseaux hypodermiques.

des tissus sphacelés. Au niveau de l'épiderme, la nécrose cesse en général d'une manière brusque; il n'en est pas ainsi en profondeur où les limites de la zone sphacélée sont beaucoup moins nettes. Au-dessous de la zone de nécrose, les faisceaux fibreux dermiques sent gonflés, d'aspect trouble, tantôt pâles, tantôt hyperchromatiques; entre eux, des coulées inflammatoires ondulantes; elles sont formées presque exclusivement de polynucléaires souvent altérés et parfois entièrement lysés.

Comme dans les stades antérieurs, et avec plus d'intensité,

l'inflammation atteint les couches profondes de la peau jusqu'aux muscles abdominaux. Dans l'hypoderme superficiel situé au-dessus du peaucier, où existent d'importants paquets vasculo-nerveux logés dans une atmosphère cellulo-adipeuse, on trouve une infiltration cellulaire diffuse, noyée dans un liquide d'œdème fibrineux. Le bouleversement est souvent tel que les cellules graisseuses elles-mêmes ne sont plus reconnues. Les polynucléaires, en général intacts, dominant, mais les monocytes sont beaucoup plus nombreux que dans le derme, surtout dans la zone des paquets vasculo-nerveux. Des lymphocytes et des éosinophiles s'ajoutent en proportions variables aux cellules émigrées. Dans l'hypoderme profond, qui forme une couche de tissu cellulaire lâche entre le peaucier et les muscles propres de la paroi, l'afflux diffus des cellules inflammatoires n'est pas moindre, mais on n'y trouve que de rares polynucléaires. Par contre, les éosinophiles sont en général assez nombreux; mais ce sont surtout les grands monocytes qui dominent, auxquels se joignent plus tardivement un nombre parfois très élevé de cellules rondes lymphocytiques. Plus on s'éloigne du foyer central de la réaction dermique, plus les polynucléaires se raréfient, tandis que les monocytes, en grande partie du type macrophage, augmentent. On note souvent des images nombreuses de phagocytose des polynucléaires et des éosinophiles par ces cellules.

Le muscle strié de la peau du cobaye forme une couche épaisse qui sépare, comme nous l'avons dit, l'hypoderme en deux étages; il est formé de larges faisceaux coupés en sens différents et logés dans une atmosphère conjonctive, qui est traversée par de volumineux paquets vasculo-nerveux, disposés entre les deux étages de l'hypoderme. Dans les réactions fortes, l'œdème écarte les faisceaux musculaires et des traînées inflammatoires s'insinuent entre eux, surtout autour des vaisseaux. Dès la cinquième heure, nous avons souvent rencontré une atteinte de certains faisceaux musculaires, qui deviennent homogènes, compacts, hypercolorables. Ils sont très vite le siège d'une infiltration intense par des polynucléaires et ils apparaissent alors comme un bloc anhisté, coloré en rose vif par l'éosine et semé d'un amas de noyaux de leucocytes. Ces phénomènes de myosite aiguë parcellaire sont particulièrement fré-

quents dans les réactions tuberculiniques. Il n'en est pas de même, semble-t-il, dans les autres types de réactions inflammatoires de la peau, en particulier dans les réactions anaphylactiques.

Les *phénomènes vasculaires* sont toujours importants dans les réactions fortes. Dès les premières heures, la congestion de nombreux capillaires et des veines est marquée. Plusieurs

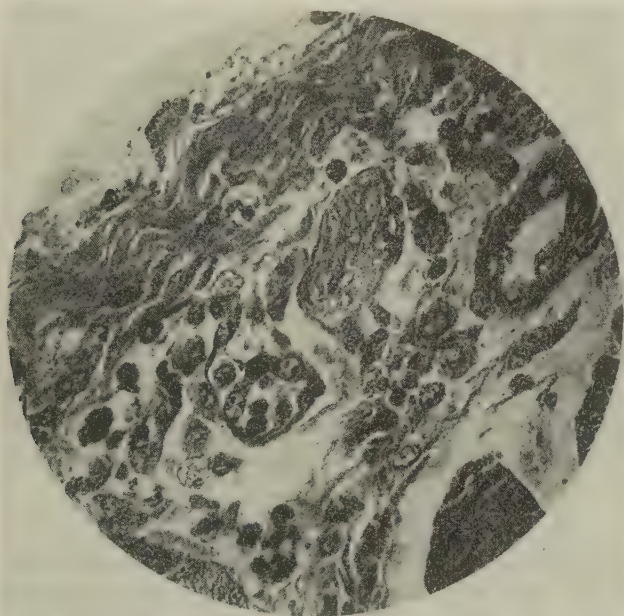


FIG. 2. — Réaction tuberculinique de vingt-quatre heures. Turgescence des endothéliums vasculaires, présence de monocytes autour des vaisseaux.

vaisseaux montrent une tuméfaction des cellules endothéliales qui font saillie dans la lumière. Il est parfois possible de rencontrer, dès la cinquième heure, des figures de mitose au niveau de ces cellules. Au contact des foyers de prolifération endothéliale qui se constituent ainsi rapidement dans certains vaisseaux, les leucocytes s'amassent et sont emprisonnés bientôt dans un coagulum fibrineux. La thrombose peut devenir totale. De nombreux petits vaisseaux du derme sont envahis et obstrués par de gros monocytes et d'autres leucocytes. Au stade de

nécrose, la paroi vasculaire se dissocie et les hématies se répandent dans les tissus. Seuls les vaisseaux du bloc de nécrose dermique présentent des altérations nécrotiques de leur paroi. Les lymphatiques de la peau sont très souvent ectasiés et très apparents dans les réactions fortes. Coupés en tous sens, ils figurent des espaces bordés d'une paroi très mince sans réaction endothéliale et contenant des lymphocytes parfois extrêmement serrés. On peut voir apparaître, parmi eux, comme une ébauche de centre germinatif formé par des cellules plus claires de type lymphoblastique. Ces phénomènes ne sont pas rencontrés avec netteté sur toutes les coupes; souvent ils sont très réduits.

Les *réactions faibles*, à la trentième heure, se distinguent par les caractères suivants : absence de nécrose et de processus hémorragique, aspect normal de l'épiderme. Les monocytes dominent toujours, même dans le derme. Dès la douzième heure, on trouve des macrophages ayant phagocyté des polynucléaires. Les phénomènes vasculaires sont moins accentués, la thrombose et la prolifération endothéliale restent discrètes. On ne rencontre jamais de nécrose des fibres musculaires. L'infiltration de l'hypoderme profond par des monocytes est toujours moins intense et plus tardive, mais elle fait rarement défaut.

ÉVOLUTION DES RÉACTIONS. — Dans les réactions d'intensité moyenne, la zone nécrosée dermo-épidermique forme une croûte mince qui s'élimine en quelques jours laissant une ulcération dont la cicatrisation est parfois étonnamment rapide. Des la quarante-huitième heure, les limites de l'escarre apparaissent très nettes, surtout du côté de l'épiderme. Au niveau du derme, elles sont indiquées par une couche continue de polynucléaires. La régénération de l'épiderme se fait à partir des bords et grâce à la couche basale qui forme, comme l'a bien vu Dienes, une étroite bande étalée au-dessous de l'ancien épiderme nécrosé. Quand l'escarre a été étendue, la cicatrisation est lente, le bloc dermo-épidermique nécrosé s'élimine en entier, le fond de l'ulcère contient alors un exsudat purulent qui recouvre une couche fibrino-leucocytaire. Dans les réactions très fortes, il n'est pas rare que le derme soit nécrosé sur

une grande partie de son épaisseur; la cicatrisation s'effectue par prolifération d'un tissu conjonctif jeune, presque exclusivement cellulaire, formé de fibroblastes disposés en couches parallèles à la surface de la peau.

Du côté du derme profond et de l'hypoderme, on voit survenir, aux stades tardifs, des phénomènes d'un ordre nouveau. Vers la soixantième heure, les foyers de monocytes et de lym-

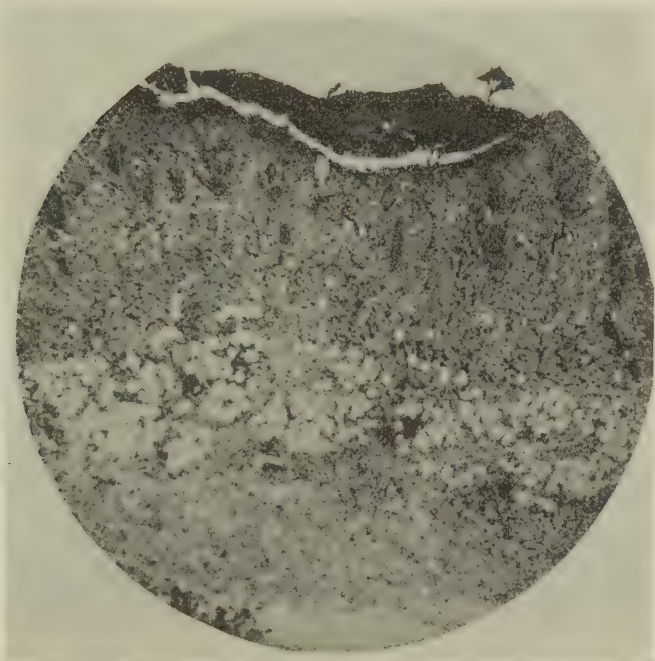


FIG. 3. — *Réaction tuberculinique forte de quarante-huit heures.* Elimination de la zone nécrosée dermo-épidermique. Infiltration dermique interfasciculaire. Oedème et infiltration diffuse de l'hypoderme où se constituent des foyers de monocytes périvasculaires.

phocytes développés autour des vaisseaux hypodermiques tendent à coufluer en une couche plus ou moins continue, très visible sur une des microphotographies ci-contre. On trouve aussi des éosinophiles parmi ces cellules. Les polynucléaires, encore nombreux dans les couches superficielles, font défaut dans les couches profondes. En certains points du derme, surtout en profondeur, au niveau de l'hypoderme et au milieu

des amas de monocytes, enfin jusque dans l'hypoderme profond, on assiste à la constitution de foyers de cellules assez volumineuses, de forme souvent géométrique et presque toujours polygonale, à cytoplasme abondant, coloré en rose violacé par le May-Grünwald ou l'érythrosine orange-bleu de toluidine, à noyau arrondi ou ovale, clair, poussiéreux, exceptionnelle-

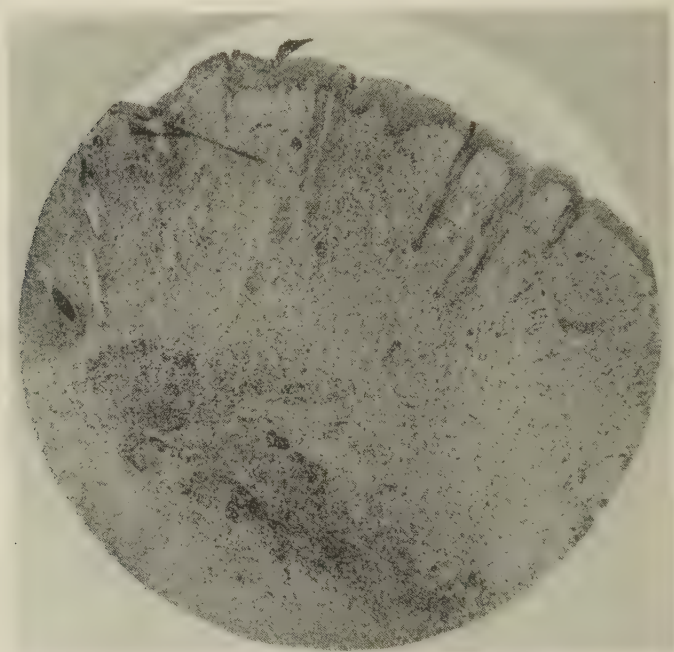


FIG. 4. — Réaction tuberculique très forte de soixante heures. A gauche la zone nécrosée dermo-épidermique a été éliminée et l'épiderme sain se glisse au-dessous des débris sphacelés. On voit se constituer une zone, tendant à devenir continue, d'infiltration hypodermique où dominent les monocytes.

ment plus dense et foncé. Ces cellules diffèrent nettement des monocytes et rappellent les cellules épithélioïdes du tissu tuberculeux. Les zones confluentes d'infiltration monocytaire et les foyers épithélioïdes néoformés constituent la première ébauche d'un tissu de granulation qui se développera dans la suite, donnant naissance à un tissu tuberculoïde particulier sur lequel l'école allemande a insisté, comme nous l'avons vu.

La constitution du tissu tuberculoïde doit être étudiée à un stade plus avancé. Elle est nette, en général, sur les coupes à partir du cinquième ou du huitième jour. Sur une coupe d'une réaction nécrotique forte, datant de douze jours et cicatrisée en quelques jours, on peut faire les constatations suivantes :

1° L'épiderme est entièrement reconstitué, il est épaissi, de hauteur irrégulière;

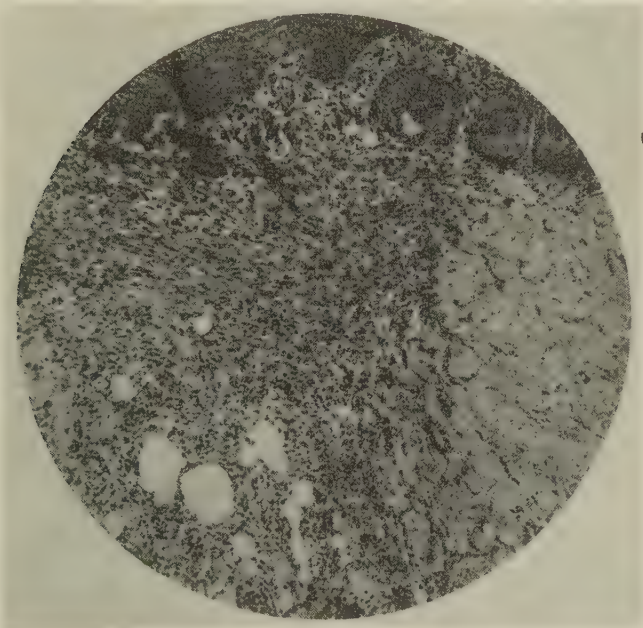


FIG. 5. — Les trois zones de réparation des lésions dans une réaction tuberculinique ancienne (douze jours).

Zone papillaire : tissu conjonctif lâche très riche en cellules.

Zone dermique proprement dite : tissu fibroblastique serré; les fibroblastes se disposent en faisceaux parallèlement à la surface de la peau.

Zone hypodermique : tissu d'aspect histiocytaire infiltré de cellules rondes.

2° La couche papillaire du derme est occupée par un tissu conjonctif jeune, contenant de très nombreux fibroblastes de forme stellaire; une énorme vascularisation néoformée a envahi ce tissu. Entre les cellules, un réticulum de fines fibrilles collagènes s'est développé. L'ensemble forme un tissu clair où les vestiges de l'inflammation sont représentés par de rares lym-

phocytes disposés en petits foyers. De chaque côté de la lésion, la limite est brusque avec la couche papillaire normale, beaucoup plus pauvre en cellules, nettement fibreuse, avec de rares capillaires.

3° Au-dessous de la couche papillaire et formant comme un pont étroit entre les zones latérales du derme proprement dit qui ont conservé la structure normale, apparaît une couche

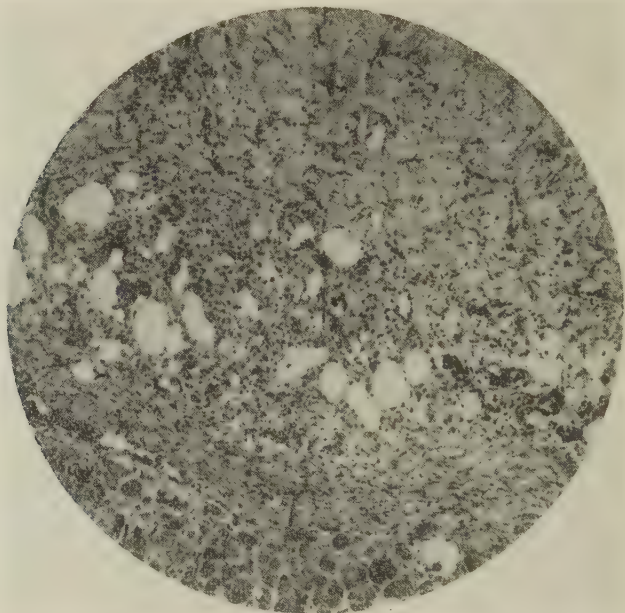


FIG. 6. — Réaction tuberculinique de douze jours. Zone de prolifération cellulaire développée dans l'hypoderme autour des cellules adipeuses. Ce tissu contient de nombreuses cellules géantes.

dense de fibroblastes fusiformes, à grand axe parallèle à la surface cutanée. Ces fibroblastes jeunes, dont le noyau est souvent volumineux et de forme arrondie ou à peine ovale, sont beaucoup plus étroitement serrés et tassés les uns contre les autres que dans la couche papillaire. Ici, encore, on trouve des néo-capillaires à lumière très réduite et à paroi presque exclusivement cellulaire. Entre les fibroblastes, de nombreuses et fines fibrilles de collagène se dessinent.

4° Dans l'hypoderme, une vaste zone s'est constituée, de forme grossièrement triangulaire, dont l'épaisseur maxima correspond à l'ancien foyer principal de la réaction. De chaque côté, au-dessus du peaucier et au-dessous des couches profondes du derme, cette zone envoie des prolongements épais, qui s'étendent bien au delà de la zone de réparation dermique. L'ensemble des tissus ainsi néoformés sur toute la hauteur de la peau est en forme de bouton de chemise, étranglé en son milieu par le derme proprement dit resté normal. Tandis que dans la couche papillaire et au niveau du derme, il s'agit d'un tissu de cicatrisation à évolution fibreuse rapide, le tissu développé dans la couche cellulo-adipeuse de l'hypoderme offre une structure différente. A un faible grossissement, il apparaît sous forme de larges travées cellulaires, délimitant des mailles étroites et vides qui représentent les cellules adipeuses. Au fort grossissement, il est presque exclusivement constitué par de grosses cellules à cytoplasme abondant, de tendance amphophile, granuleux et de chromophilie variable suivant les éléments. Le noyau de ces cellules, arrondi ou ovalaire, central ou périphérique, est du type vésiculeux, clair, à membrane peu distincte; il contient deux ou trois gros blocs volumineux de chromatine sur un fond poussiéreux. Exceptionnellement on rencontre des noyaux denses, uniformément sombres. Nettement distinctes les unes des autres en général, de forme carrée, polygonale, à contours angulaires, ces cellules paraissent se fondre souvent pour former des plasmodies multinucléés, qui donnent en certains points l'image de véritables nids de noyaux. Des espaces clairs, que traversent de minces filaments protoplasmiques disposés en un fin réseau, séparent fréquemment ces cellules.

On trouve aussi dans ce tissu de véritables cellules géantes dont le cytoplasme est, en général, très chromophile et nettement acidophile. De taille et de forme variables, elles sont parfois arrondies ou ovalaires, avec une couronne de noyaux périphériques. L'identité de ces éléments avec le type Langhans est alors évidente, mais on ne trouve jamais la moindre trace de caséification centrale. D'autres fois, leur forme est tout à fait irrégulière, défiant toute description; assez souvent elles entourent en entier une cellule grasseuse. Il arrive aussi que

dans l'intérieur ou au contact d'une de ces cellules géantes on trouve un petit amas de noyaux extrêmement fragmentés, tassés les uns contre les autres et agglomérés dans un dépôt de fibrine.

Ce tissu est parcouru par quelques travées conjonctives cellulo-fibreuses et par un réseau à grosses mailles irrégulières de fines fibrilles de collagène. Le contraste est manifeste entre la pauvreté de cette trame et l'abondance des néo-fibrilles collagènes développées dans le tissu de cicatrisation qui a envahi le derme.

Ce tissu tuberculoïde est infiltré d'une manière irrégulière par des cellules rondes lymphocytiques et par quelques rares plasmocytes; les cellules rondes sont excessivement nombreuses en certains points. Au sein de ces plages cellulaires, on trouve de nombreux vaisseaux: capillaires néo-formés et vaisseaux anciens présentant une réaction endothéliale accrue qui va parfois jusqu'à l'obturation quasi complète de la lumière. Il existe aussi une prolifération des cellules conjonctives de l'adventice.

L'aspect général du tissu que nous venons de décrire traduit sa nature exacte histiocyttaire ou, si l'on veut, d'ordre réticulo-endothélial. Sa structure rappelle celle que nous avons étudiée du tissu de granulation tuberculeux développé dans la peau à la suite de la surinfection expérimentale, mais on n'y rencontre ni la structure folliculaire, ni la moindre trace de caséification. Les figures de mitose y sont peu nombreuses; pourtant on en observe quelques-unes avec une très grande netteté sur certaines coupes.

Notons enfin que le tissu hypodermique profond, situé au-dessous du peaucier, participe aux remaniements histologiques. On y trouve des îlots et des blocs de tissu épithélioïde avec une infiltration lymphocytaire diffuse; ces foyers se développent surtout autour des paquets vasculo-nerveux. Il en est de même au niveau des travées interfasciculaires du peaucier et, là aussi, c'est autour des vaisseaux et des nerfs qui traversent cette couche musculaire que les réactions cellulaires sont les plus vives.

III. — Les réactions inflammatoires de la peau comparées avec la réaction tuberculinique.

Si l'on veut préciser dans quelle mesure la structure de la dermo-réaction à la tuberculine réalise un tableau d'inflammation spécifique, il est nécessaire de la comparer avec celle d'autres réactions inflammatoires cutanées, en particulier avec la structure des réactions anaphylactiques de la peau. C'est pourquoi nous nous sommes proposé d'étudier divers types de réactions du cobaye sensibilisé au blanc d'œuf, au sérum de cheval et aux protéides extraits du bacille de Koch, dont A. Boquet et G. Sandor ont montré récemment la nature anaphylactique.

A. — ÉTUDE HISTOLOGIQUE DES RÉACTIONS CUTANÉES ANAPHYLACTIQUES.

L'étude histologique du phénomène d'Arthus a été faite pour la première fois par Arthus et Breton. Mais ce sont les recherches de Gerlach et celles plus récentes d'Opie qui ont permis d'en tracer le tableau histo-pathologique détaillé. Gerlach a insisté sur la précocité de l'œdème et sur la rapidité avec laquelle s'installe la nécrose des petits vaisseaux de la peau d'où résultent des hémorragies qui s'infiltrent entre les faisceaux conjonctifs. Il a observé que les endothéliums capillaires sont tuméfiés dans une large zone autour du champ inflammatoire, et qu'il se produit, à la suite de la réaction, une mobilisation des histiocytes aboutissant à l'organisation rapide du foyer par un tissu conjonctif jeune. Huit jours après l'injection déchaînante, la cicatrisation est déjà très avancée.

Opie a été frappé surtout par l'importance des phénomènes vasculaires. Les altérations des vaisseaux consistent dans la nécrose avec infiltration inflammatoire de la paroi et thrombose hyaline de la lumière. Le thrombus est envahi par les leucocytes; bientôt la place des vaisseaux n'est plus marquée que par un petit amas de noyaux de leucocytes fragmentés, constitués surtout par des polynucléaires. Pour Opie, les lésions des parois vasculaires résultent de la production à leur

niveau d'une substance toxique due à la rencontre de l'antigène injecté avec l'anticorps apporté par le sang. Cet anticorps serait une précipitine. Pour Dienes et Mallory, la réaction allergique se différencierait de la réaction anaphylactique par la prédominance des monocytes, sauf au stade moyen de la réaction.

Dans nos expériences, faites sur le cobaye, nous avons étudié des réactions anaphylactiques fortes ou très fortes et des réactions faibles non nécrotiques. Ces réactions ont été obtenues par l'injection intradermique dans la peau des flancs de 0 c.c. 1 du même protéide [blanc d'œuf, sérum de cheval, protéides du bacille tuberculeux (1)] qui avaient servi à la sensibilisation préalable de l'animal. Cette sensibilisation a pu être obtenue par des injections uniques ou multiples de l'antigène par voie sous-cutanée ou intrapéritonéale. Les réactions faibles, non nécrotiques, sont rencontrées sur des animaux peu sensibles ou sensibilisés depuis peu de temps (dix jours). Les prélèvements ont été faits après cinq heures, vingt-quatre heures, trente heures et pour les stades tardifs après dix et quinze jours.

Nous avons pu ainsi établir le tableau suivant, réalisé par une réaction anaphylactique forte :

Cinq heures après l'injection, l'œdème est déjà abondant et dissocie les faisceaux dermiques qui deviennent troubles. Cet œdème fibrineux, coagulé par les liquides fixateurs, forme, sur les coupes, un fin réseau coloré en rose vif par l'éosine et visible sur toute la hauteur de l'hypoderme et par places dans le derme. L'épiderme, en général peu touché, paraît simplement aminci par la distension des tissus ; néanmoins, en certains endroits, les noyaux ne sont plus colorables. En d'autres points, une nécrose brutale réduit en entier l'épiderme en une bande amorphe hyperacidophile. Par ailleurs, d'autres noyaux épidermiques sont frappés de pycnose et le cytoplasme présente des lésions de dégénérescence trouble. Ces altérations épidermiques diffèrent nettement de celles qui caractérisent les réactions tuberculiniques. C'est ainsi que nous n'avons pas

(1) Les réactions anaphylactiques produites par l'injection de protéides du bacille tuberculeux à des cobayes sensibilisés par des injections préalables de ces substances ont été obtenues par MM. Boquet et Sandor. Les coupes que nous avons examinées proviennent de leurs expériences.

rencontré sur nos coupes de phénomènes de nécrose progressive avec dissociation de la couche moyenne du corps muqueux signalé par Arthus et Breton, chez le lapin éprouvé par voie sous-cutanée. Après cinq heures, le derme est le siège d'une infiltration cellulaire beaucoup plus discrète que celle que l'on observe dans les réactions tuberculiniques intenses. Cette infiltration est diffuse, mais prédomine autour des vaisseaux, surtout dans les couches profondes du derme. Il s'agit presque exclusivement de polynucléaires neutrophiles plus ou moins altérés et d'éosinophiles en général beaucoup mieux conservés. Ceux-ci sont souvent si abondants, aussi bien dans le derme que dans l'hypoderme, particulièrement autour des vaisseaux profonds, que l'on trouve parfois, dans les zones altérées, de très nombreuses granulations éosinophiles essaimées entre les faisceaux. Les monocytes affluent en moins grand nombre.

Contrastant avec l'intensité modérée de l'infiltration cellulaire, on note des altérations marquées des faisceaux collagènes. Nous avons dit que ces faisceaux sont dissociés par l'œdème ; ils apparaissent de ce fait pâles et troubles. En certains points, dans les couches superficielles de la peau, la nécrose du collagène est manifeste ; les fibres transformées en une matière amorphe, forment des taches à contours diffus, colorées uniformément en rose par l'éosine ; les limites des faisceaux fibreux cessent d'être distinctes.

Si nombre de petits capillaires dermiques sont encore intacts et gorgés d'hématies, d'autres ont subi la nécrose totale, ce qui entraîne des hémorragies abondantes disposées en nappes diffuses, qui infiltreront les tissus. Certains sont thrombosés ; leurs parois nécrosées, méconnaissables, forment une sorte de fin réseau fibrinoïde, où toute trace de noyaux endothéliaux et de limites cellulaires ont disparu ; ce réseau est infiltré de polynucléaires. La lumière de ces capillaires est occupée, en entier ou en partie seulement, par un thrombus homogène contenant des leucocytes (thrombose hyaline). Au niveau de l'hypoderme, on remarque une infiltration cellulaire plus intense, où les polynucléaires, en meilleur état que ceux du derme, dominant aussi. Dans les couches profondes de la peau, les altérations brutales des vaisseaux sanguins ne sont pas moins importantes que dans le derme. On observe les

mêmes phénomènes de nécrose massive de la paroi vasculaire avec hémorragies interstitielles intenses. Les artères elles-mêmes sont totalement thrombosées, leur paroi œdématisée apparaît trouble. S'il s'agit d'une réaction très forte, il ne reste pas un seul vaisseau intact dans cette zone de la peau; la plupart sont entièrement détruits: une masse rose vif à structure très finement réticulaire, à limites diffuses, infiltrée de

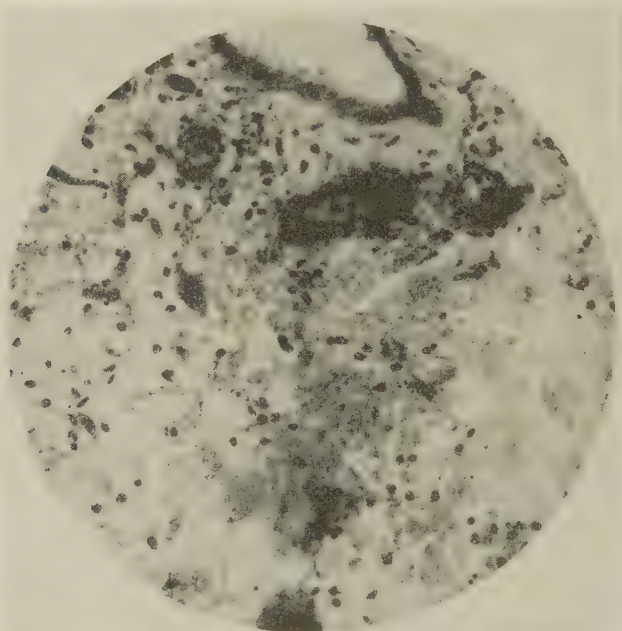


FIG. 7. — Réaction anaphylactique forte de cinq heures aux protéides du bacille tuberculeux. Nécrose des parois vasculaires infiltrées de leucocytes, ayant entraîné des hémorragies interstitielles abondantes. Remarquer l'œdème des faisceaux fibreux du derme environnant, qui paraissent gonflés, pâles et troubles (à la partie supérieure de la figure un follicule pileux déshabité).

leucocytes très altérés, marque leur place. Ce type spécial de lésions vasculaires intenses est très caractéristique des fortes réactions anaphylactiques. On ne trouve jamais cette nécrose massive des gros vaisseaux hypodermiques dans les réactions tuberculiques où les hémorragies sont cantonnées dans la zone superficielle de nécrose dermique. L'extension des hémorragies aux couches profondes de la peau explique l'intensité de

la tache circulaire rouge vineux qui décèle dès les premières heures une forte réaction anaphylactique.

Bien que le fait ait été signalé par Gerlach dans le phénomène d'Arthus, nous n'avons pas trouvé sur nos coupes les signes de dégénérescence parcellaire des faisceaux musculaires du peaucier si fréquemment rencontrés dans les réactions allergiques. Quand la nécrose s'étend au peaucier, ce qui est rare, elle se produit aussi d'une manière brutale et massive, sans qu'on puisse observer de localisations du processus à quelques faisceaux isolés.

Les réactions anaphylactiques atteignent leur acmé vers la cinquième heure et les prélèvements opérés après vingt-quatre et trente heures ne montrent pas de modifications sensibles. L'œdème abondant persiste, l'infiltration inflammatoire est de même nature et prédomine autour des vaisseaux hypodermiques. Parmi les cellules émigrées, on rencontre des éosinophiles avec la même abondance qu'à la cinquième heure. Les altérations nécrotiques sont plus nettes à ces stades tardifs et se répartissent par foyers épars dans le derme, mais développés spécialement autour des vaisseaux. Ces foyers, constitués surtout par des polynucléaires à noyau fragmenté, commencent à être envahis par des cellules à noyau unique, clair, polymorphe, à cytoplasme faiblement basophile et à limites indistinctes. On retrouve ces cellules un peu partout, formant des bandes, des blocs, des îlots; parmi elles, on peut voir déjà de véritables cellules géantes. Les polynucléaires qui ont envahi l'hypoderme présentent aussi, à ce stade, des altérations intenses : pycnose du noyau avec phénomène de karyorhexis, lyse protoplasmique; beaucoup sont phagocytés par de nombreux macrophages dont certains contiennent 3 ou 4 cellules. Le nombre des lymphocytes augmente dans l'exsudat inflammatoire.

Naturellement, les réactions cutanées anaphylactiques obtenues chez les animaux très peu sensibles se caractérisent par des phénomènes inflammatoires moins intenses. Pourtant, l'œdème est toujours important, à la fois dermique et hypodermique, dissociant les faisceaux fibreux écartés et gonflés. L'épiderme est en général intact. Dans le derme, l'infiltration cellulaire diffuse apparaît très modérée, sauf autour de certains vais-

seaux. La nécrose vasculaire, beaucoup moins accusée que dans les réactions fortes, ne donne pas lieu, en général, aux hémorragies interstitielles; néanmoins de nombreux vaisseaux présentent un véritable œdème de leurs parois, le protoplasma des cellules endothéliales tuméfiées, écartées, forme une sorte de réseau de minces fibrilles. Les noyaux de ces cellules endothéliales sont volumineux et clairs, parfois de formes très irrégulières, comme fripés. Il est à noter que les monocytes sont plus abondants que dans les réactions fortes, mais ils ne prédominent jamais aussi nettement que dans les réactions tuberculiniques faibles. Après vingt-quatre heures, néanmoins, ils deviennent très nombreux dans la couche cellulo-adipeuse de l'hypoderme, où ils forment un véritable tissu de granulation. Comme dans les réactions fortes, cette couche est déjà le siège d'une réaction histiocyttaire. On peut juger, à ce stade, de l'importance des altérations vasculaires : artères thrombosées, prolifération intense et désordonnée des endothéliums, multiplication des cellules de l'adventice.

La structure des dermo-réactions anaphylactiques à la période d'état se distingue donc nettement de celle des réactions tuberculiniques. Il nous a paru nécessaire de rechercher si la différence est aussi marquée aux stades tardifs de réparation des lésions. Dans ce dessein, nous avons examiné des coupes de fragments de peau prélevés dix et quinze jours après l'injection d'épreuve sur des cobayes de sensibilité forte ou moyenne.

Une réaction anaphylactique très forte peut encore se révéler après quinze jours par une ulcération non cicatrisée. La brèche dermo-épidermique est recouverte d'une croûte fibrineuse; sur les bords de l'ulcération, l'épiderme paraît épaissi et envoie à la surface de la partie mortifiée une mince membrane développée à partir de la couche basale. Le fond est constitué par un tissu conjonctif surtout cellulaire, contenant de nombreuses cellules inflammatoires, des lymphocytes surtout. Il s'agit d'un tissu extrêmement vasculaire et du type « bourgeon charnu »; les lymphatiques y sont béants; çà et là, on reconnaît quelques restes de nécrose : amas de noyaux fragmentés ou petits blocs de fibrine. Dans la partie qui correspond à la zone serrée du derme, ce jeune tissu conjonctif fibroblastique offre une structure plus dense; il est tissé d'une abondante et

fine trame de collagène néo-formé. Les fibroblastes tassés les uns contre les autres forment des faisceaux, des tourbillons, des spirales ; les plus nombreux se disposent parallèlement à la surface de la peau. Comme dans les couches superficielles, la néo-vascularisation est intense ainsi que l'infiltration cellulaire constituée par des lymphocytes, des monocytes, des plasmocytes. Cette couche de tissu conjonctif jeune envahit toute la

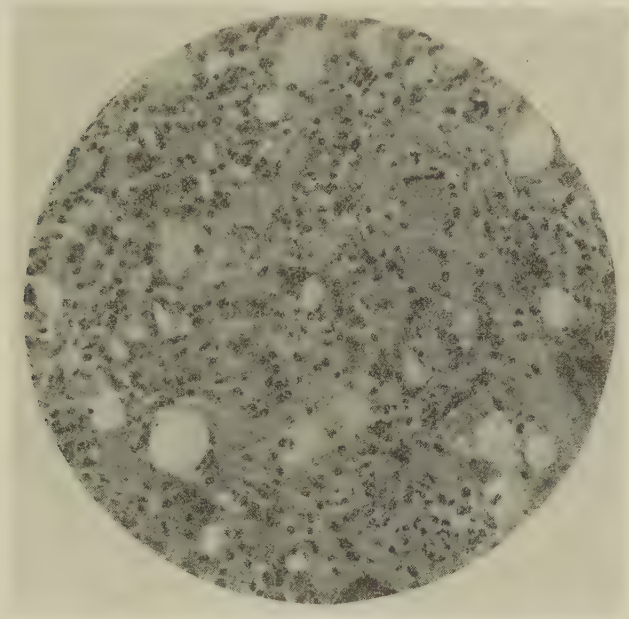


FIG. 8. — Réaction anaphylactique très forte au blanc d'œuf datant de quinze jours. Tissu d'aspect histiocytaire ayant envahi l'hypoderme, formé de cellules très irrégulières à tendance tantôt syncytiale, tantôt giganto-cellulaire. Il est infiltré de cellules rondes lymphocytiques et contient de très nombreux débris de noyaux fragmentés.

hauteur de la peau et atteint souvent le peaucier qu'elle dissocie également ; de nombreux faisceaux musculaires ont ainsi disparu, étouffés par le tissu cicatriciel.

Comme dans les réactions tuberculiniques, les phénomènes les plus intéressants s'observent au niveau des couches profondes du derme et dans l'hypoderme. Il s'est développé, à cet endroit, une couche d'un tissu de réaction histiocytaire de type épithé-

lioiide; cette couche est interrompue au niveau du foyer principal de la lésion par le tissu conjonctif cicatriciel. Le tissu épithélioïde est formé par de nombreuses cellules volumineuses, très polymorphes, qui tendent à constituer des syncythiums multinucléés et de véritables cellules géantes, souvent du type Langhans. Comme dans les réactions tuberculiniques, ce tissu est logé dans une charpente collagène, formée de fines fibrilles

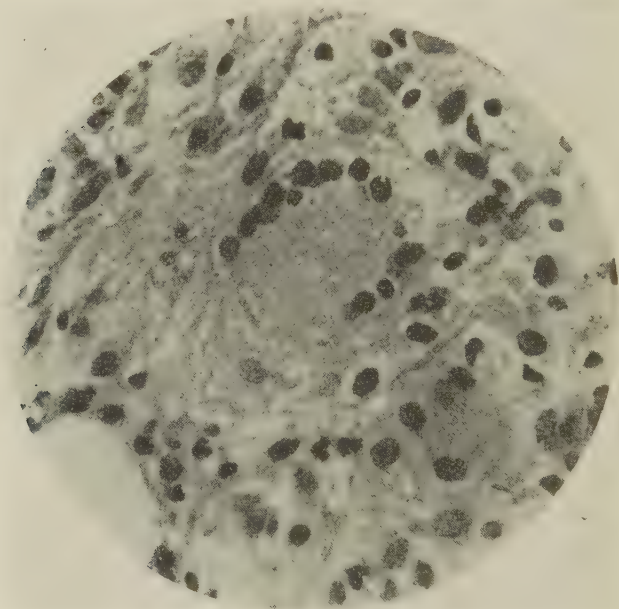


FIG. 9. — Réaction anaphylactique de douze jours au sérum de cheval. Une cellule géante à couronne de noyaux périphériques, au sein d'un tissu de même type que celui de la figure précédente.

disposées en réseau à larges mailles: il contient des capillaires néo-formés et il est infiltré d'une manière très irrégulière par des cellules rondes. On peut trouver quelques amas épars de ces cellules histiocytaires au sein même du tissu conjonctif jeune de cicatrisation, qui envahit le derme et l'hypoderme au niveau du foyer principal de la réaction.

A ces stades tardifs, on assiste, en général, au retour de la perméabilité des gros vaisseaux hypodermiques. Ces vaisseaux

montrent alors une lumière étroite, contenant des hématies logées à l'intérieur d'un amas de cellules à limites indistinctes, à cytoplasme granuleux, comme réticulaire, amas souvent infiltrés encore par des cellules rondes ou par des polynucléaires. Les artères elles-mêmes présentent un épaississement de leurs parois. La thrombose de certaines veines hypodermiques n'a pas encore disparu ; leur lumière est occupée par de nombreux polynucléaires, par des cellules rondes et des cellules endothéliales proliférées. A l'intérieur même du thrombus, on trouve de tout petits capillaires néo-formés. On voit donc que tous les vaisseaux importants portent des traces nettes de la gravité des atteintes qu'ils ont subies.

S'il s'agit d'une réaction moyenne n'ayant pas entraîné d'ulcération, on ne constate plus guère de traces de l'inflammation après dix jours, sauf dans les couches profondes. Dans la couche cellulo-adipeuse de l'hypoderme, la trame épaissie du réseau que forment les cellules graisseuses est constituée par un tissu de réaction histiocytaire de même type que celui que nous venons de décrire. On y décele toujours de nombreuses cellules géantes, en particulier autour de certaines cellules graisseuses ; certaines englobent dans leur protoplasma des amas de leucocytes agglutinés. Le derme contient quelques foyers et bandes de ce même tissu épithélioïde qui écarte les faisceaux fibreux et tend à se développer autour des vaisseaux. Indépendamment des cellules épithélioïdes, de nombreuses cellules rondes sont réparties un peu partout, ainsi que d'assez nombreuses mastzellen isolées et des éosinophiles. Les lésions vasculaires tardives de ces réactions moyennes sont moins nettes, mais de même ordre que celles des réactions intenses : endo- et péri-vascularite, abondante vascularisation néo-formée.

Cette étude des stades tardifs montre qu'on ne saurait opposer les réactions anaphylactiques aux réactions allergiques en ce qui concerne les processus de réparation. Il est surtout intéressant de constater que le tissu dit tuberculoïde, contenant des cellules géantes, n'est nullement l'apanage des réactions tuberculiques. Nous pensons qu'il représente simplement un mode particulier de réaction de la peau consécutive aux lésions inflammatoires aiguës et étendues.

B. — RÉACTIONS INFLAMMATOIRES SIMPLES DE LA PEAU
DU COBAYE SAIN ET TUBERCULEUX.

A titre de comparaison, nous avons étudié les manifestations inflammatoires qui se produisent dans la peau du cobaye à la suite d'injections de diverses substances plus ou moins irritantes.

L'eau salée physiologique, par exemple, n'entraîne pas de réaction durable ; on trouve quelques polynucléaires émigrés dans le derme après deux heures. Mais au bout de vingt-quatre heures, il ne subsiste d'autre trace de cette inflammation que la présence de quelques cellules rondes, éparses dans la couche papillaire.

Le bouillon simple, non glyciné, produit une réaction plus durable. Au bout de vingt-quatre heures, la couche papillaire du derme et les couches profondes hypodermiques sont le siège d'une infiltration cellulaire nette. Certaines papilles dermiques sont envahies par de nombreux lymphocytes et par des monocytes de petite taille. On y trouve souvent des éosinophiles, quelques mastzellen, mais les polynucléaires font presque entièrement défaut. Dans le derme proprement dit, d'assez nombreux monocytes et des macrophages sont présents entre les faisceaux. La réaction domine dans l'hypoderme ; elle est diffuse et constituée par de nombreux polynucléaires, le plus souvent très altérés, présentant des phénomènes intenses de pycnose et de karyorhexis. A côté d'eux, il existe quelques cellules rondes et surtout d'énormes macrophages extrêmement actifs, à noyau irrégulier et sombre, excentrique. Certains renferment jusqu'à quatre ou cinq polynucléaires phagocytés. Cette invasion secondaire des foyers de réaction inflammatoire par des macrophages succédant aux polynucléaires apparaît donc comme un phénomène général ; elle n'est nullement spécifique de la réaction tuberculinique.

Le bouillon glyciné pur et la tuberculine diluée au 1/10 produisent toujours chez l'animal sain une réaction inflammatoire nettement plus intense que celle que produit le bouillon simple. Après vingt-quatre heures, il persiste souvent un peu d'œdème surtout hypodermique, les polynucléaires sont plus

nombreux; l'infiltration cellulaire prédomine aussi dans les couches profondes de la peau où il s'est produit une réaction macrophagique très intense. L'épiderme, par contre, est parfaitement sain, tout au plus, peut-on noter la présence de quelques figures de mitose au niveau de la couche basale.

La réaction produite par la tuberculine chez l'animal sain s'efface assez vite. Après cinq jours, on n'en trouve plus guère de trace; l'épiderme est simplement légèrement épaissi; le derme paraît intact dans sa couche papillaire. Pourtant l'hypoderme ainsi que les couches profondes du derme contiennent quelques foyers, parfois assez importants, de grosses cellules irrégulières, du type histiocyttaire, qui tendent, par places, à former des éléments syncytiaux multinucléés. C'est surtout autour des paquets vasculo-nerveux que ces formations apparaissent. Il n'est pas rare de trouver quelques gros vaisseaux hypodermiques présentant une légère réaction endothéliale.

La peau de l'animal tuberculeux se montre-t-elle, comme beaucoup d'auteurs l'ont prétendu, plus sensible que la peau de l'animal sain aux substances irritantes banales? Le bouillon simple et surtout le bouillon glycérimé, injectés à des animaux tuberculeux en bon état, provoquent, en effet, d'après nos expériences, l'apparition d'une inflammation macroscopique nettement appréciable encore après vingt-quatre heures. Sur les coupes d'une de ces réactions produites par le bouillon glycérimé, on trouve l'image d'une papule tuberculinique de très faible intensité: il existe des coulées de polynucléaires entre les faisceaux dermiques; l'hypoderme est envahi par de multiples cellules émigrées; les polynucléaires y sont nombreux, mais les monocytes prédominent, surtout autour des vaisseaux. Ces constatations nous amènent à poser le problème de l'importance des afflux monocytyques chez les animaux tuberculeux à la suite des irritations locales. Il est certain, nous l'avons vu, que dans les réactions tuberculiniques le nombre des monocytes est toujours très considérable, surtout dans les réactions faibles, où ils représentent la quasi-totalité des cellules émigrées. Dans les réactions inflammatoires au bouillon simple ou glycérimé, les monocytes affluent plus tôt chez les tuberculeux que chez l'animal sain puisque, déjà après deux heures, on

en trouve un assez grand nombre à côté des polynucléaires. Se superposant à la réaction macrophagique diffuse et banale qui a envahi l'hypoderme, il se constitue, chez l'animal tuberculeux, des zones d'infiltration monocytique intense autour des vaisseaux. Ce phénomène n'offre jamais cette importance chez l'animal sain.

Bref, si la réaction tuberculinique se rapproche des réactions inflammatoires banales, produites chez l'animal sain par des substances irritantes contenant des peptones ou de la glycérine, elle s'en distingue aussi par la qualité des cellules inflammatoires : l'afflux monocytique se produisant plus tôt et surtout d'une façon plus marquée chez l'animal tuberculeux que chez l'animal sain. Il s'agit là d'une aptitude réactionnelle propre à l'animal tuberculeux.

D'autre part, il est intéressant de constater qu'il n'y a guère qu'une différence d'intensité entre la réaction tuberculinique des cobayes allergiques et celle que produit le bouillon glycéринé chez le même animal.

Il est pourtant certains caractères de la réaction allergique que nous n'avons pu observer même chez l'animal tuberculeux par l'injection de substances irritantes non spécifiques. Nous voulons parler surtout de la nécrose progressive qui, dans les réactions fortes, frappe l'épiderme, les couches superficielles du derme et souvent les faisceaux musculaires striés du peaucier. Cette nécrose lente laisse en quelque sorte le temps aux cellules inflammatoires (polynucléaires en particulier) d'envahir et de dissocier les tissus atteints comme le fait est particulièrement évident pour l'épiderme. Il est possible que des inflammations autres que celles que nous avons étudiées puissent produire ce résultat ; mais sur nos coupes nous n'avons rencontré ce processus que dans les réactions tuberculiniques.

Par contre, le stade précoce de l'inflammation qui suit immédiatement l'injection de tuberculine n'est nullement spécifique. L'œdème précoce, les phénomènes de dilatation vasculaire avec diapédèse des polynucléaires, la turgescence de nombreux fibroblastes et cellules endothéliales se rencontrent aussi bien dans la peau de l'animal sain, injecté avec du bouillon ou de la tuberculine, qu'au début de la réaction

tuberculinique. Ces altérations traduisent un processus banal de réponse tissulaire à toute injection irritante; ce n'est que plus tard, après quatre à cinq heures, que la réaction tuberculinique commence à se distinguer par l'intensité progressivement croissante de l'inflammation et par l'apparition des premiers signes de dégénérescence des tissus.

En ce qui concerne le rapprochement entre les dermo-réactions allergiques et anaphylactiques, il est essentiel de remarquer que dans toutes ces manifestations, on observe une succession constante d'un double processus, exsudatif et nécrotique d'une part, prolifératif d'autre part. Ce dernier atteint les cellules conjonctives; il entraîne la formation de cellules géantes et ne s'accompagne que d'un afflux leucocytaire minime. On peut admettre que le processus principal, qui est aussi primaire, exprime l'altération et la destruction des constituants tissulaires et que le processus prolifératif ne représente guère que des images secondaires de résorption par les histiocytes. Ce double processus exsudatif-nécrotique et prolifératif se rencontre, ébauché, dans les réactions inflammatoires banales que produisent les injections de bouillon peptoné, de tuberculine chez l'animal sain. On est ainsi conduit à penser qu'il s'agit là d'une réaction biologique d'ordre général. Il est d'ailleurs possible que le processus dégénératif trouve jusqu'à un certain point sa source en lui-même, les produits issus de la désintégration des éléments tissulaires contribuant à entretenir la réaction inflammatoire. Cette hypothèse a été émise par A. Boquet, en particulier à propos des phénomènes vasculaires dans l'inflammation allergique : la vaso-dilatation locale que l'on observe dans les réactions tuberculiniques serait en rapport direct avec la présence de substances peu diffusibles, « douées de propriétés capillaro-motrices comparables à celles de l'histamine » et élaborées par les cellules locales altérées. Il semble qu'on puisse d'ailleurs englober parmi ces éléments réactionnels la substance conjonctive elle-même. L'importance de l'œdème du collagène a, en effet, frappé plusieurs observateurs, dont certains, comme Gerlach, attribuent, à la propriété du collagène d'absorber énergiquement le liquide exsudé, un rôle de premier plan dans l'apparition de la nécrose locale.

Il devient donc possible d'envisager, du point de vue dyna-

mique, les différences d'ordre statique révélées par l'analyse histologique entre la réaction d'allergie et la réaction d'anaphylaxie. Dans l'une, caractérisée par son évolution rapide, « impétueuse », par l'intensité des altérations vasculaires et du processus exsudatif, la nécrose est massive, brutale, précoce; dans l'autre, caractérisée par son évolution lente et progressive, la désintégration des éléments tissulaires observée sur les coupes s'opère également avec lenteur et graduellement. Ce qui traduit l'importance de cette différence de mécanisme entre ces réactions, c'est que, du point de vue histologique comme du point de vue biologique, l'évolution générale des processus est, dans une large mesure, indépendante de l'état de sensibilité du sujet et de la dose d'antigène. Après un court stade d'inflammation banale, provoquée par l'injection d'une substance irritante, l'inflammation évolue pour son propre compte et affecte une allure différente, suivant que le facteur dégénératif frappe d'une manière brutale ou progressive les éléments réactionnels. Ce n'est pas dans le cadre de cette étude que peut se placer celle du mécanisme intime de cette dégénérescence tissulaire. Nous avons voulu simplement attirer l'attention sur les hypothèses qu'on peut fonder sur l'examen histologique comparé du groupe si particulier des réactions inflammatoires d'hypersensibilité.

IV. — Cytologie des réactions tuberculiniques.

Les phénomènes inflammatoires qui se succèdent dans la peau des animaux tuberculeux après l'injection de tuberculine posent de multiples problèmes cytologiques, dont aucun n'a d'ailleurs encore reçu de solution définitive. Dans les premiers stades de l'inflammation, pendant la période d'état de la réaction, les cellules libres abondent dans l'exsudat inflammatoire. Afin de les étudier dans les conditions les plus favorables, nous avons ponctionné les papules à l'aide de pipettes finement effilées. On peut ainsi recueillir facilement une quantité d'exsudat d'autant plus importante que l'on ponctionne plus profondément la peau. Ces exsudats, étalés directement sur lames, ont été colorés par la méthode de May-Grünwald-

Giemsa et par le bleu de méthylène à 1 pour 500 suivant la technique de coloration supravitale de Sabrazès.

Les ponctions du derme ne donnent que très peu de liquide, dans lequel on trouve de nombreux polynucléaires souvent altérés, présentant des images de pycnose nucléaire, de fragmentation du noyau, de cytolyse. C'est surtout au stade de réaction maxima et dans les réactions nécrotiques que ces cellules deviennent extrêmement abondantes dans l'exsudat recueilli. Les monocytes, les lymphocytes, les éosinophiles accompagnent les polynucléaires, mais sont beaucoup plus rares.

Les ponctions profondes, hypodermiques, fournissent un exsudat plus abondant, surtout dans les réactions fortes, accompagnées d'un volumineux œdème. En confirmation des résultats de l'examen histologique, on constate que, dans ces exsudats profonds, les polynucléaires sont plus rares : en général ce sont les monocytes qui dominent nettement, parfois dans la proportion de 60 p. 100. On trouve aussi des lymphocytes plus ou moins nombreux (de 15 à 50 p. 100). Quand il s'agit de réactions fortes, des éosinophiles typiques accompagnent les autres cellules. Leur nombre peut s'élever jusqu'à 20 à 30 p. 100, mais ils font défaut en général dans les réactions moyennes et faibles.

Cette méthode des ponctions est surtout utile parce qu'elle permet d'étudier les éléments cellulaires d'une manière très minutieuse. De tous ces éléments, ce sont les monocytes qui sont les plus intéressants. Ils se présentent en général sous l'aspect uniforme de grandes cellules de 10 à 15 μ de diamètre, à gros noyau sombre, le plus souvent excentrique, à chromatine disposée en réseau serré avec quelques gros blocs discernables. La forme de ce noyau est arrondie ou ovalaire, parfois plus ou moins lobée, réniforme, en fer à cheval ou très irrégulière. Le cytoplasme est abondant, nettement basophile et très granuleux, bourré d'enclaves, de taille et de forme irrégulières, les unes incolores, les autres colorées en rose. Certaines vacuoles, qui paraissent vides, prennent une extension considérable, envahissent toute la cellule et repoussent le noyau.

Ces monocytes sont, nous l'avons dit, de dimensions fort variables, depuis de petits éléments lymphocytiformes à proto-

plasma déjà très granuleux, jusqu'à de grandes cellules de 15 à 20 μ de diamètre dont la nature macrophagique est révélée par la présence, à leur intérieur, d'inclusions cellulaires (polynucléaires surtout). Pour la plupart, ils jouissent de la propriété dévolue aux histiocytes de fixer énergiquement l'encre de Chine ou le carmin lithiné mélangé *in vitro* avec l'exsudat et porté à l'étuve. Un autre caractère important consiste dans la fréquence relative des figures de mitose de type régulier, qu'il est plus facile de constater sur les frottis d'exsudat que sur les coupes.

Nous ne pouvons nous étendre ici sur les nombreuses variétés de monocytes de formes atypiques que nous avons rencontrées dans les exsudats. L'une d'elles cependant mérite d'être mentionnée. Il s'agit d'éléments assez volumineux et de formes irrégulières, à contours parfois imprécis, grossièrement polygonaux, à cytoplasme beaucoup plus homogène que celui des monocytes, nettement basophile et assez pâle, à gros noyau irrégulier, avec un réseau chromatinien très distinct à mailles lâches, montrant souvent un nucléole net. Ce type de cellules rappelle en tous points celui des histioblastes. On les trouve d'une manière irrégulière selon les cas.

Le problème des relations entre les monocytes du tissu conjonctif enflammé et les monocytes du sang circulant est très difficile à résoudre et les opinions varient suivant les auteurs. Nous ne pouvons entrer ici dans le détail de la discussion. Il semble toutefois que l'opinion éclectique de Maximow sur l'inflammation tende à prévaloir. Pour cet auteur, les lymphocytes et les monocytes du sang émigrent dans le tissu enflammé, s'hypertrophient et bientôt ne peuvent plus être distingués des macrophages dérivés de certaines cellules fixes, c'est-à-dire des histiocytes et des cellules migratrices au repos. Maximow précise même que les cellules mononucléaires des tissus enflammés proviennent des cellules non granuleuses du sang pour le plus grand nombre et seulement pour un faible pourcentage des histiocytes préexistants.

Ce point de vue est basé sur le petit nombre des histiocytes présents dans les tissus, l'absence de mitose et d'amitose et la forte émigration de granulocytes. Il est certain, en effet, que, sur les coupes, les monocytes dominent dans

l'atmosphère vasculaire et qu'il existe en même temps de nombreuses cellules semblables à l'intérieur des vaisseaux. Récemment Long, dans ses expériences sur l'infection tuberculeuse expérimentale de la cornée, a observé que les monocytes ne succèdent à l'afflux primitif des polynucléaires qu'au moment où apparaissent les capillaires néoformés, par conséquent d'autant plus vite que le point d'infection se trouve plus près du limbe scléro-cornéen. Il a pu saisir le passage de ces monocytes à travers les parois vasculaires. Bloom et Lewis, Carrel et Ebeling, Hetherington et Pierce ont signalé l'apparition de phagocytes (macrophages) et de fibroblastes dans les cultures de sang normal. Tous ces auteurs s'accordent à reconnaître que les phagocytes et les fibroblastes néoformés dérivent des leucocytes non granuleux.

Seul Von Mollendorf nie toute émigration cellulaire d'origine sanguine. Notant l'absence de figures de mitose dans les stades jeunes de l'inflammation, il explique l'origine des innombrables cellules de l'exsudat par la division rapide et répétée des fibroblastes par amitose. Cette opinion a été combattue en particulier par Bloom lors de ses expériences sur la culture du sang.

Nos recherches sur la réaction tuberculinique ne nous ont pas permis de nous faire une opinion sur l'origine des monocytes que l'on rencontre en si grande abondance dans l'exsudat inflammatoire. Nous avons vu néanmoins que les caractères de ces cellules les identifient aux histiocytes ou macrophages, mais il n'est pas possible de se prononcer sur le point de savoir s'il s'agit ou non d'une transformation rapide des monocytes sanguins émigrés. Un point paraît éclairci : c'est l'existence de figures de mitose dans les monocytes de l'exsudat. Par contre, il est plus difficile de dire s'il existe des phénomènes d'amitose ; on trouve d'assez nombreuses cellules bi-ou multi-nucléées, et on assiste parfois, comme sur la microphotographie ci-après, au début de la division cytoplasmique. Il peut d'ailleurs s'agir là de l'aboutissement d'une mitose régulière.

Il est un autre problème cytologique que pose l'étude de la réaction allergique. C'est celui de la nature du tissu tuberculoïde qui tend à former une couche continue dans l'hypoderme ou à se disposer en quelques foyers dermiques, et qui se déve-

loppe à la suite de l'inflammation aiguë. On a vu que Bessau, Zieler et ses élèves considèrent ce tissu comme un véritable tissu tuberculeux dont on retrouverait tous les éléments : cellules épithélioïdes, cellules rondes lymphocytiques, cellules géantes. C'est la présence de ces cellules géantes dans les réactions anciennes qui a suscité le plus de recherches et les plus nombreuses hypothèses. Étant données les relations

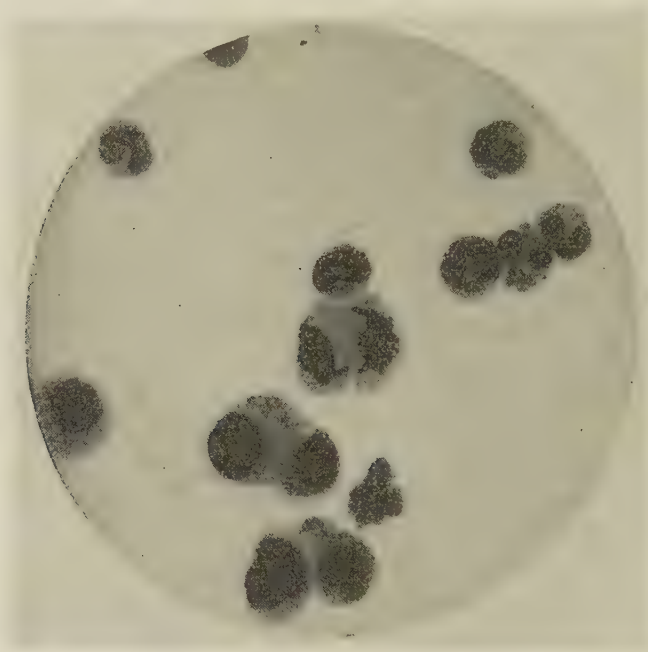


FIG. 40. — Trois monocytes en voie de division dans un exsudat hypodermique d'une réaction tuberculinique très forte de trente heures. Remarquer au centre la belle figure de karyokinèse.

étroites entre les cellules géantes et les bacilles tuberculeux, on a pensé naturellement que, dans la réaction tuberculinique, leur présence était due aux corps bacillaires que la tuberculine renferme. Le premier, Daels émit cette opinion, Bandler et Kriebich tentèrent d'établir des différences entre la cellule de Langhans et les cellules géantes et épithélioïdes dues aux corps étrangers. Klingmuller obtint des cellules géantes avec une tuberculine filtrée. On lui objecta qu'il s'agissait de parti-

cules bacillaires filtrables. Zieler tenta de réfuter cette objection en montrant qu'on obtenait aussi des cellules géantes avec le dialysat de cultures de bacilles tuberculeux et il établit que le nombre de ces cellules n'est pas en rapport avec celui des bacilles. Steward et Rhoads sont d'avis que les cellules géantes des réactions tuberculiniques sont dues à la présence de tissus nécrosés et en particulier du tissu graisseux. Ils ont noté, ce

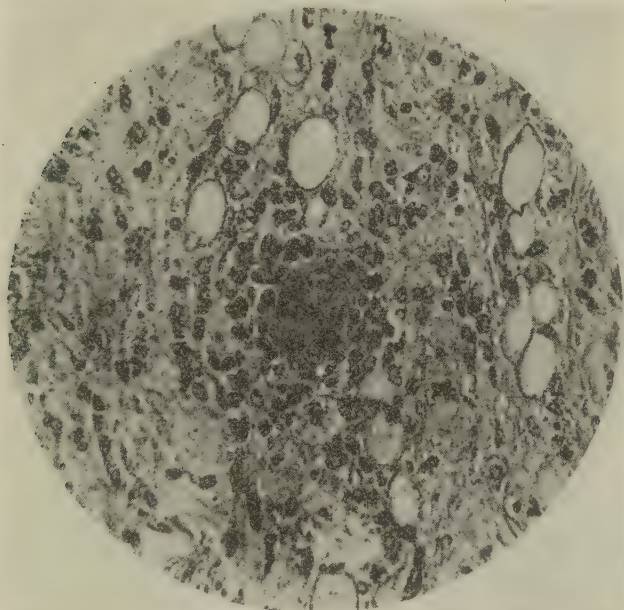


FIG. 11. — Une cellule géante isolée dans l'hypoderme rencontrée, dans un cas, au cours d'une réaction tuberculinique forte de trente heures.

qui nous paraît exact, que les cellules géantes se développent souvent au voisinage ou autour d'une cellule adipeuse et parfois à proximité de débris nécrotiques de collagène ou de fibrine. C'est aussi l'opinion de Medlar pour qui la séparation des cellules géantes en deux types : type Langhans à noyau périphérique et cellules géantes à corps étranger, n'est pas justifiée. Pour Sabin et ses collaborateurs, qui ont insisté sur cette distinction, il y aurait une cellule géante primitive due à la fusion de plusieurs cellules épithélioïdes, ce qui confirme

l'hypothèse de Borrel; ces cellules, apparaissant à un stade pré-nécrotique, seraient directement en rapport avec les produits bacillaires. A côté, on distinguerait des cellules secondaires à la nécrose, beaucoup plus polymorphes et accompagnées d'une plus grande variété de cellules inflammatoires. Ces cellules géantes de corps étrangers ne présenteraient pas, à la coloration supra-vitale au rouge neutre, l'image de sphères

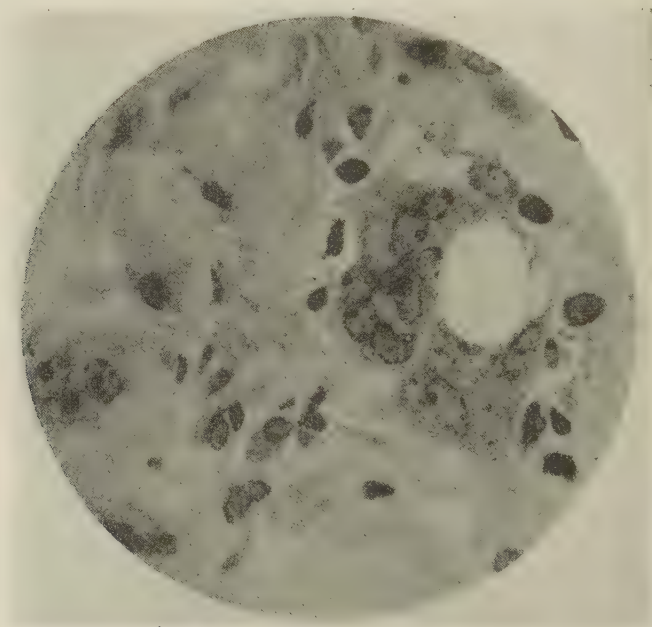


FIG. 12. — *Réaction tuberculinique de douze jours.* Une cellule géante de forme très irrégulière, apparue dans un tissu tuberculoïde, et entourant entièrement une cellule adipeuse.

attractives dites « rosettes », caractéristique des cellules épithélioïdes et du monocyte dont elles dérivent. Les cellules géantes de corps étranger pourraient être rencontrées dans les réactions tuberculiniques à côté d'autres éléments qui seraient dus à l'action des bacilles de Koch contenus dans la tuberculine. L'application de cette méthode d'analyse par coloration supra-vitale au rouge neutre n'est d'ailleurs pas de réalisation facile sur les coupes; on ne saurait oublier non plus que l'accord

est loin d'être fait parmi les cytologistes sur la valeur exacte de ces tests de coloration établis par F. Sabin et ses collaborateurs.

En réalité, l'hypothèse qui rattache la production des cellules géantes à l'élimination des produits de nécrose paraît séduisante si l'on tient compte de la facilité avec laquelle on obtient la formation de ces cellules dans la peau dont la structure a été

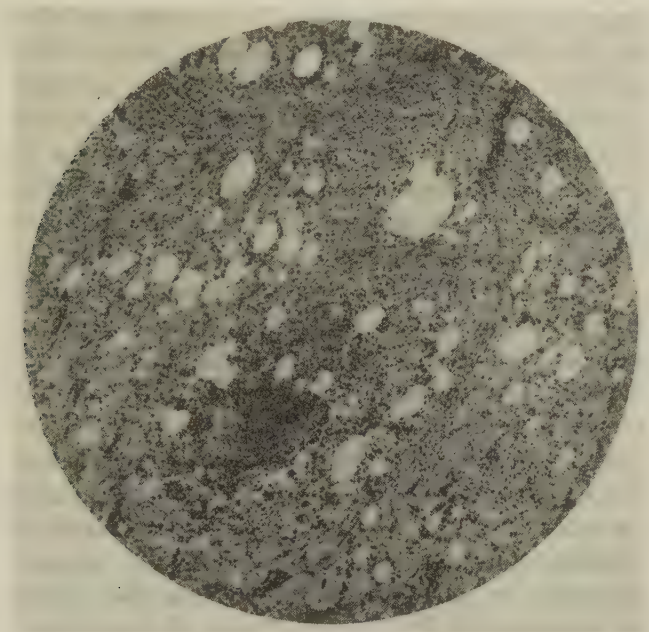


FIG. 13. — Un micro-abcès développé au sein d'un tissu tuberculoïde au huitième jour d'une réaction à la tuberculine diluée au 1/10 et enrichie de bacilles morts (0 milligr. 0001 pour 0 c.c. 1).

bouleversée par une inflammation aiguë intense. Blumenberg cite de nombreux cas où les cellules géantes étaient consécutives à des inflammations sans aucun rapport avec la tuberculose. Nye et Parker produisent des cellules géantes du type Langhans dans les tissus par injection intraveineuse de différentes bactéries. Wright obtient les mêmes résultats par l'injection sous-cutanée de gaz. Dans le précédent chapitre nous avons signalé la présence de cellules géantes dans des réactions anaphylac-

tiques ou inflammatoires de diverses natures. Il paraît logique de penser qu'il s'agit bien là de réactions du système histiocytaire de la peau à la nécrose des tissus consécutive à l'inflammation aiguë. L'addition de bacilles tuberculeux morts (0 milligr. 0001) à la tuberculine injectée à des animaux de sensibilité moyenne nous a donné une réaction allergique d'abord typique, qui a évolué dans la suite de la même manière qu'une réaction normale sans abondance particulière de cellules géantes; mais il s'est constitué dans les couches profondes du derme un véritable micro-abcès riche en polynucléaires, tout à fait semblable à celui que nous avons obtenu constamment dans la surinfection de la peau par des bacilles vivants. La présence de bacilles modifie donc la réaction non pas dans le sens d'une production de cellules géantes, mais en l'orientant vers l'abcédation. En employant le filtrat sur bougie Chamberland L₂ de culture de bacilles virulents en milieu de Santon, nous avons obtenu, par contre, après quelques jours, la formation d'un tissu tuberculoïde très développé et contenant de nombreuses cellules géantes (voir micro-photo fig. 6).

Bien entendu, les considérations qui précèdent se rapportent aussi au tissu tuberculoïde qui accompagne les cellules géantes. Le fait que les premiers foyers de ce tissu apparaissent dans l'atmosphère périvasculaire, là où les monocytes dominent également, montre qu'il est presque impossible de savoir si les cellules épithélioïdes dérivent des monocytes, opinion qui semble prévaloir de plus en plus à la suite des travaux de Maximow, de Carrel et Ebeling, de Bloom et Lewis, de Long, de Sabin et ses élèves. Baumgarten voyait plutôt dans la cellule épithélioïde le résultat de la prolifération et de la transformation de la cellule conjonctive fixe.

En résumé, la formation au stade tardif de la réaction tuberculinique et d'autres réactions inflammatoires de la peau, en particulier des réactions anaphylactiques, d'un tissu d'aspect histiocytaire, composé de cellules irrégulières à tendance tantôt syncytiale, tantôt giganto-cellulaire, nous paraît être la conséquence en quelque sorte banale d'une inflammation aiguë. Bien que ce tissu soit infiltré de cellules rondes lymphocytiques, sa structure ne prend jamais le type folliculaire; pourtant il n'est pas possible de différencier ces éléments de ceux qui consti-

tuent le granulome des surinfections de la peau, tel que nous l'avons décrit. La question se pose de savoir dans quelle mesure la présence de ce tissu formé au cours de la réaction allergique d'épreuve participe à la constitution du granulome de surinfection.

V. — Résumé et conclusions.

Il résulte de nos recherches, ainsi que de celles de nombreux auteurs qui se sont occupés de la question, qu'il est possible d'identifier un type de réactions allergiques tuberculiniques de la peau. Les caractères essentiels de ces réactions consistent en :

la diffusion et l'extension de l'infiltration inflammatoire ;

l'existence dans le derme de coulées cellulaires inter-fasciculaires où les polynucléaires dominant et d'une infiltration diffuse de l'hypoderme ;

l'importance de l'infiltration à monocytes qui prédominent nettement dès la sixième heure dans les couches profondes, entre les cellules graisseuses et de part et d'autre du peaucier. Il en résulte la formation de foyers monocytiques péri-vasculaires dont l'étendue est assez caractéristique des réactions allergiques. Dans les réactions faibles, les monocytes prédominent à tous les stades de la réaction, aussi bien dans le derme que dans l'hypoderme.

L'épiderme, dans les réactions fortes, est atteint d'un type particulier de nécrose progressive qui frappe d'abord la couche moyenne du corps muqueux, remplacée par une infiltration infiniment abondante de polynucléaires ; dans la suite, l'épiderme est entièrement détruit, mais il commence à se reformer, dès la quarante-huitième heure, à partir de l'épiderme sain des bords de l'ulcération. La cicatrisation complète exige rarement plus de cinq jours. A cette nécrose épidermique s'ajoute une nécrose plus ou moins étendue des couches superficielles du derme.

Il faut noter aussi l'importance de l'œdème, surtout visible au niveau de l'hypoderme, où il se forme un réseau fibrineux. Les altérations de périendovascularite apparaissent intenses, et les lymphatiques dilatés sont gorgés de lymphocytes.

Ces réactions atteignent leur acmé vers la trentième heure,

puis elles disparaissent rapidement. Mais, dans les jours qui suivent, il se constitue, au sein des couches profondes du derme et dans l'hypoderme, une couche, qui tend à devenir continue, d'un tissu de granulation de nature histiocytaire, formé de cellules semblables aux cellules épithélioïdes tuberculeuses et contenant des cellules géantes et des cellules rondes lymphocytiques. Les premiers foyers de cellules épithélioïdes apparaissent dans l'atmosphère péri-vasculaire dès la soixantième heure. Il semble que ce tissu représente bien plus une réaction histiocytaire banale de la peau, due à la présence de résidus que laissent les inflammations aiguës intenses, qu'un véritable tissu tuberculeux dont il ne possède jamais la disposition folliculaire.

La réaction tuberculinique se distingue nettement de la réaction anaphylactique de la peau. Dans celle-ci les phénomènes sont beaucoup plus rapides et plus brutaux, la nécrose frappe en bloc les tissus (épiderme notamment) et atteint d'une manière élective les parois vasculaires, ce qui entraîne des hémorragies intenses; cette nécrose des parois vasculaires se retrouve dans les couches profondes de la peau, caractère que l'on n'observe pas dans les réactions allergiques. L'abondance de l'œdème, la rareté relative des cellules inflammatoires dans le derme, la prédominance des polynucléaires et l'accumulation des éosinophiles constituent les autres caractères différentiels principaux des réactions anaphylactiques.

En outre, les altérations vasculaires sont tellement intenses qu'elles peuvent encore être appréciées plusieurs jours après l'injection déchainante. Elles entraînent souvent la production d'ulcérations longues à guérir.

Si à la période d'état elles se distinguent nettement des réactions tuberculiniques, les réactions anaphylactiques aboutissent, comme celles-ci, à la production tardive d'un tissu de granulation histiocytaire contenant des cellules géantes.

Le phénomène complexe que représentent toutes les réactions locales d'hypersensibilité, allergiques ou anaphylactiques, évolue donc suivant un double processus : un *processus primaire et principal* essentiellement exsudatif et dégénératif, caractérisé par une nécrose locale, accompagnée d'œdème fibrineux et d'une émigration cellulaire massive; un *processus*

secondaire et tardif de résorption par le mésenchyme des résidus de l'inflammation aiguë. Ce processus prolifératif aboutit à la formation d'un tissu tuberculoïde contenant des cellules épithélioïdes, des cellules géantes et des cellules rondes.

La comparaison entre la réaction tuberculinique de l'animal allergique et celle que produit, chez l'animal sain, l'injection intracutanée de substances irritantes (bouillon simple, bouillon glyciné, tuberculines) montre qu'il existe de nombreux points communs entre ces deux ordres de manifestations. C'est ainsi que l'on retrouve, dans tous les cas, un afflux de polynucléaires aux premières heures, une réaction macrophagique plus tardive, une accumulation de cellules émigrées au niveau de l'hypoderme où elles forment une infiltration diffuse. Néanmoins, il est incontestable que l'animal tuberculeux réagit par un afflux de monocytes plus précoce et surtout notablement plus important. On peut trouver dans ces faits une explication au moins partielle des caractères particuliers de l'inflammation allergique provoquée par la tuberculine.

C'est surtout une différence d'intensité qui distingue les réactions inflammatoires des animaux tuberculeux, d'une part à la tuberculine, et, d'autre part, aux liquides irritants. Mais la nécrose progressive, à topographie particulière, nous paraît constituer un caractère spécial de la réaction tuberculinique.

BIBLIOGRAPHIE

- ARTHUS et BRETON. *C. R. Soc. Biol.*, **55**, 1903, p. 1479.
 AUCHÉ et AUGISTROU. *C. R. Soc. Biol.*, **68**, 1910, p. 331.
 BAUMGARTEN. *Ztschr. f. Klin., med.*, **9**, 1885, p. 93.
 BANDLER et KREIBRICH. *Deutsch. med. Wochenschr.*, 1902, p. 1629.
 BESSAU. *Münch. med. Wochenschr.*, 1915, p. 323; *Jahrb. f. Kinderheilk.*, 1915, p. 371 et 482; *Berl. Klin. Wochenschr.*, 1916, p. 80.
 BLOOM. *Archiv. f. Exper. Zellforsch.*, **11**, 1931, p. 145.
 BLUMENBERG. *Beitr. zur Klinik der Tuberk.*, **61**, 1925, p. 509. (Bibliographie.)
 BOQUET (A.). *C. R. Soc. Biol.*, **107**, 1931, p. 109.
 BOQUET (A.) et BRETEY (J.). *C. R. Soc. Biol.*, **113**, 1933, p. 1412.
 BOQUET (A.) et SANDOR (G.). *C. R. Soc. Biol.*, **114**, 1933, p. 434.
 CARREL et EBELING. *Journ. of Exp. Med.*, **36**, 1922, p. 365.
 CUNNINGHAM, SABIN, SUGIYAMA et KINDWALL. *Bull. Johns. Hopk. Hosp.*, **37**, 1923, p. 231.
 DAELS. *Mediz. Klin.*, **4**, 1908, p. 58.
 DIENES et MALLORY. *Amer. Journ. of Path.*, **8**, 1932, p. 689.
 DIENES. *Journ. of Immunology*, **24**, 1933, p. 253.

- DEAN, SABIN et FORKNER. *Journ. of Exp. Medic.*, 52, 1930, 2, supplément n° 3, p. 89.
- GERLACH. *Virch. Archiv.*, 247, 1923, p. 294 (bibliographie).
- HETHERINGTON et JACKSON PIERCE. *Arch. f. exp. Zellforsch.*, 12, 1931, p. 1.
- LAPORTE (R.). *C. R. Soc. Biol.*, 113, 1933, p. 1409; 114, 1933, p. 99; 115, 1934, p. 1206.
- LONG et HOLLEY. *Am. Journ. of Path.*, 9, 1933, p. 337.
- MAXIMOW. *Journ. inf. diseases*, 37, 1925, p. 418; *Physiol. Review*, 5, 1924, p. 533.
- MEDLAR. *Am. Journ. of Path.*, 2, 1926, p. 275.
- MENKIN. *J. of Exp. Med.*, 50, 1929, p. 179; 51, 1930, p. 285.
- MENKIN (V.) et MENKIN (M.). *J. of Exper. Med.*, 51, 1930, p. 285.
- NAEGELI, DE QUERVAIN et STALDER. *Klin. Wochenschr.*, 9, 1930, p. 924.
- NYE et PARKER. *Am. Jour. of Path.*, 6, 1930, p. 381.
- OPIE. *J. of Immunology*, 8, 1923, p. 59 et p. 19; 9, 1924, p. 258.
- ROULET. *Annales d'Anat. pathol.*, 8, 1931, p. 359.
- SELTZER (H.). *Z. Immunit. Forsch.*, 32, 1924, p. 325.
- SPEHL (P.). *Arch. de Méd. exp.*, 25, 1913, p. 239.
- STEWART et RHODS. *Am. J. of Path.*, 2, 1926, p. 571.
- WRIGHT. *Am. J. of Path.*, 6, 1930, p. 87.
- ZIELER. *Münch. Med. Wochenschr.*, 1908, p. 1685; *Dtsch. med. Wochenschr.*, 1911, p. 2075; *Zeitschrift f. Tuberk.*, 36, 1922, p. 119.
- ZIELER et HAMEL. *Beitr. zur Klinik der Tuberk.*, 28, 1928, p. 620.
- ZINSSER (H.). *J. of Exp. Medic.*, 34, 1921, p. 495.
- ZINSSER (H.) et TAKEO TAMIYA. *J. of Exp. Med.*, 44, 1926, p. 753.

L'OXYTROPHIE ET LA NUTRITION DES FLAGELLÉS LEUCOPHYTES

par ANDRÉ LWOFF et HISATAKE DUSI.

(Laboratoire de Protistologie de l'Institut Pasteur.)

On sait que certains Flagellés blancs, pourvus de plastes et dépourvus de chlorophylle (Leucophytes), possèdent, comme les plantes vertes, la propriété de faire la synthèse de réserves glucidiques figurées, amidon ou paramylon.

Cette synthèse, liée à une structure déterminée — présence d'un plaste — est corrélative de propriétés physiologiques particulières que nous nous proposons d'examiner ici. Notre étude porte sur une Chlamydomonadinée incolore : *Polytoma uvella*, un Euglénien expérimentalement décoloré : *Euglena gracilis*, un Euglénien naturellement incolore : *Astasia Chattoni*, et une Cryptomonadine également incolore dans la nature, *Chilomonas paramæcium*.

*
* *

Nous avons pu, en effet, isoler en culture bactériologiquement pure deux nouveaux organismes fabriquant de l'amidon ou du paramylon. Nous avons, par ailleurs, réussi à remplacer les acides gras inférieurs, jusqu'ici spécifiques, par l'amidon lui-même. Ce sont ces nouvelles recherches que nous exposons ici.

Pour tout ce qui concerne les souches et les techniques des expériences, nous renvoyons au mémoire de A. Lwoff (1932).

*
* *

Polytoma uvella. — Un acide gras inférieur est indispensable à ce flagellé (E. G. Pringsheim, 1921). Les acides gras utilisables sont les acides à chaîne linéaire renfermant dans leur

molécule moins de 5 atomes de carbone (A. Lwoff, 1932). Pour nos nouvelles expériences nous avons utilisé le milieu suivant (milieu D) :

Asparagine	2
Chlorure de potassium	0,25
Sulfate de magnésium.	0,25
Phosphate monopotassique	0,25
Phosphate monocalcique	0,01
Perchlorure de fer.	0,005
Eau distillée.	1.000
Soude	Q. S. pour $pH = 8,3$

Dans ce milieu, les cultures de *Polytoma* sont nulles ou très pauvres. Elles ne renferment pas plus de 1 flagellé par millimètre cube (dixième passage). D'ailleurs, fait curieux, la multiplication très restreinte qui se produit dans ce milieu n'a lieu que dans les trois ou quatre premiers jours qui suivent l'ensemencement (tubes de 10 cent. cubes de milieu ensemencés avec 1 goutte de culture). Il n'y a jamais enrichissement ultérieur des cultures et tout se passe comme si cette très faible multiplication initiale avait lieu aux dépens de quelque impureté de l'asparagine.

Si l'on ajoute au milieu de l'acétate de sodium (2 grammes pour 1.000), on obtient des cultures très riches, renfermant jusqu'à 7.500 flagellés par millimètre cube.

Nous rappelons que l'acide butyrique peut remplacer l'acide acétique, mais qu'aucun des autres acides étudiés : acides propionique, isobutyrique, valérianique normal, caproïque normal, œnanthylique normal, caprylique normal, lactique, pyruvique, glycérophosphorique, oxalique, succinique, α - α -diméthylsuccinique, malique, tartrique, citrique, ne peut remplacer les acides gras inférieurs : acide acétique et acide butyrique normal.

Dans une nouvelle série d'expériences, nous avons pu constater que le glucose, le lévulose, la dextrine et l'inuline sont dépourvus de toute action.

La spécificité des acides gras inférieurs semblait donc étroite. Cependant, nous avons été amenés à la conclusion (A. Lwoff, 1932) que les acides gras étaient utilisés pour la synthèse des lipides d'une part, des glucides figurés de poids moléculaire élevé d'autre part. Si, vraiment, l'acide acétique était utilisé

pour la synthèse de l'amidon, on pouvait logiquement penser que l'amidon pourrait remplacer l'acide acétique. Au milieu D, nous avons donc ajouté 2 p. 1.000 d'amidon soluble (*amylum solubile* de Merck, d'après Zulkovsky).

Alors que dans les milieux à l'asparagine seule la densité maxima des cultures est de 1 flagellé par millimètre cube, dans le milieu D additionné d'amidon la densité atteint régulièrement 150 à 200 flagellés par millimètre cube. Le développement dans ce milieu D + amidon est rapide, le maximum de densité étant atteint vers le quatrième ou sixième jour à 22° et les repiquages en série, continués jusqu'au dixième repiquage, donnent toujours les mêmes résultats. D'autre part si, dans le milieu D, on remplace l'aliment azoté organique : asparagine, par un corps azoté minéral : sulfate d'ammonium, la culture est naturellement impossible, mais l'addition d'amidon (2 p. 1.000) permet l'obtention de cultures abondantes, renfermant jusqu'à 250 flagellés par millimètre cube, et repiquables en série. *L'amidon peut donc remplacer les acides butyrique et acétique pour la nutrition carbonée de Polytoma uvella.* Ce fait sera discuté dans la dernière partie de ce travail.

*
* *

Euglena gracilis à l'obscurité (race blanche). — Nous avons montré que le flagellé vert *Euglena gracilis*, après trente mois de culture à l'obscurité, entraînant la perte de la chlorophylle, a besoin, en plus des solutions peptonées suffisantes pendant les premiers mois de vie sans lumière, d'un acide gras inférieur qui doit être à chaîne linéaire et renfermer dans sa molécule moins de 7 atomes de carbone (A. Lwoff et H. Dusi, 1931 ; A. Lwoff, 1932; H. Dusi, 1933).

Nous avons utilisé notre souche d'*Euglena gracilis* entretenue depuis 1929 à l'obscurité en milieu peptoné + acétate de sodium. Nos nouvelles expériences ont été réalisées dans le milieu D (de $pH = 7,0$) où l'asparagine était remplacée par la « peptone de soie » Roche. Dans ce milieu, *Euglena gracilis* (à l'obscurité) se multiplie de façon misérable : densité maxima des cultures inférieure à 1 flagellé par millimètre cube.

Si l'on ajoute de l'acétate de sodium, on obtient des cultures

très riches : 300 flagellés par millimètre cube. L'addition d'inuline, de dextrine, d'arabinose, de xylose, de galactose, de saccharose, de lactose, de maltose, de glucose, de lévulose, est sans action sur la multiplication. Rappelons ici que, comme pour *Polytoma uvella*, les acides phénylacétique, pyruvique, lactique, tartrique, malique, succinique, citrique, glycérophosphorique ne produisent pas d'augmentation de la multiplication (A. Lwoff et H. Dusi, 1931). Mais pour *Euglena gracilis*, comme pour *Polytoma*, l'amidon soluble, à la dose de 2 p. 1.000, exerce une action très nette sur le développement des cultures. En quelques jours on observe, en présence d'amidon, un développement qui atteint une densité de 30 flagellés par millimètre cube. Après une dizaine de jours, les flagellés prennent la forme palmelloïde. Il nous faut remarquer ici que nous avons utilisé un échantillon de « peptone de soie » autre que celui dont nous nous étions servis en 1931 et qui était épuisé. Le stock de 1931 ne permettait pas, même additionné d'acétate de sodium, la moindre culture d'*Euglena gracilis* à l'obscurité. Aucun des deux échantillons, ni celui de 1931, ni celui de 1934, ne permettent d'entretenir la culture du Cilié *Glaucoma piriformis* (culture bactériologiquement pure). D'autre part, avec de nouveaux échantillons de peptone pancréatique de viande, nous réussissons à obtenir des cultures pauvres, alors qu'en 1931 toute multiplication était impossible, aussi bien dans la peptone pancréatique de muscle que dans la peptone pepsique de muscle non additionnées d'acétate de sodium. En 1931, nos expériences avaient duré six mois, c'est-à-dire que chaque peptone avait été essayée plusieurs fois, soit seule, soit en présence d'acides organiques divers qui, rappelons-le, ne sont pas toxiques puisque le développement des cultures négatives à l'obscurité a lieu à la lumière. On peut s'expliquer ces divergences. On a affaire ici à des produits organiques complexes bien loin d'être définis et jamais identiques à eux-mêmes d'un échantillon à l'autre. Il est fort possible que, dans certains cas, il se produise au cours de la digestion une ébauche de fermentation acétique ou butyrique. La présence possible d'une trace d'acide gras dans certains échantillons de peptone expliquerait les écarts entre les résultats obtenus.

D'ailleurs, la peptone de viande en question n'a jamais permis de cultures abondantes; la densité maxima observée a été de 30 flagellés par millimètre cube. L'entretien de la souche décolorée en milieu peptoné seul a été commencé le 10 février 1933 et continué jusqu'en juin 1934 (vingt et unième repiquage). Mais les cultures sont devenues très régulièrement de plus en plus pauvres et les tubes de culture du vingt et unième passage ne montrent, même après deux mois, qu'un développement absolument insignifiant (moins de 0,1 flagellé par millimètre cube).

Les expériences réalisées avec la soie hydrolysée montrent en tout cas que l'amidon peut remplacer l'acide acétique pour la nutrition carbonée d'*Euglena gracilis* blanche, à l'obscurité.

*
* *

Astasia Chattoni n. sp. — Il s'agit d'un Euglénien blanc, découvert par E. Chatton dans une mare d'eau douce des environs de Banyuls-sur-Mer, isolé par lui en culture mixte sur eau de blé et dont il a bien voulu nous confier une souche en nous proposant d'en faire l'étude physiologique.

Cet Euglénien est voisin d'*Astasia Dangeardi*. Il en diffère cependant par quelques caractères qui nous obligent à en faire le type d'une espèce nouvelle dont nous nous contenterons ici de noter brièvement les principaux caractères morphologiques.

Astasia Chattoni est une forme naturellement et définitivement incolore, qui mesure (forme flagellée mobile) de 40 à 48 μ de long sur 11 à 13 μ de large. Flagelle court, d'environ les 2/3 de la longueur du corps. Pas de stigma visible *in vivo*. Pas de pigment carotinoïde à l'endroit où devrait se trouver le stigma. Nombreux grains de paramylon ovoïdes, surtout abondants dans la moitié postérieure du corps. Nous avons isolé de cet organisme trois souches bactériologiquement pures, chacune à partir d'un seul individu purifié par 18 lavages consécutifs en eau peptonée + acétate de sodium. Le milieu d'entretien est le milieu D (de $pH=7,0$) dans lequel l'asparagine est remplacée par une peptone pancréatique de viande. Dans ces conditions, *Astasia Chattoni* donne des cultures très riches renfermant de 300 à 500 flagellés par millimètre cube. Il en

est tout autrement si la peptone de viande est remplacée par la soie hydrolysée à 2 p. 1.000. Dans ce nouveau milieu, la densité des cultures est de 50 flagellés par millimètre cube jusqu'au troisième repiquage, de 8 environ au cours des cultures ultérieures.

Les acides citrique et tartrique, l'arabinose, le xylose, le galactose, le glucose, le lévulose, le saccharose, le lactose, le maltose, la dextrine et l'inuline sont absolument sans action sur la multiplication.

L'acide acétique permet d'obtenir, dans le milieu à la soie hydrolysée, des cultures abondantes (240 par millimètre cube), l'amidon soluble (à 2. p. 1.000) des cultures moins abondantes (104 flagellés par millimètre cube). Enfin, les acides lactique et pyruvique exercent une action considérable sur la multiplication d'*Astasia Chattoni*, les cultures renfermant, par exemple, 236 flagellés par millimètre cube en présence d'acide lactique, 454 par millimètre cube en présence d'acide pyruvique.

Rappelons que les acides pyruvique et lactique sont absolument dénués de toute action et ne peuvent servir d'aliment carboné à *Polytoma uvella* ni à *Euglena gracilis* blanche.

Donc, *Astasia Chattoni* peut se multiplier parfaitement dans un milieu de culture où l'aliment azoté est représenté par une peptone de viande. Dans un milieu à base de soie hydrolysée, la multiplication est insignifiante et les acides acétique, lactique et pyruvique, ainsi que l'amidon, exercent sur cette multiplication une activation considérable.

*
* *

Chilomonas paramæcium. — Ce flagellé incolore, qui renferme de nombreux grains d'amidon, a été obtenu pour la première fois en culture pure par Glaser et Coria (1930). Sa nutrition a été étudiée par J. B. Loefer (1933-1934) et par Mast et Pace (1933).

D'après Mast et Pace, *Chilomonas paramæcium* serait un organisme chimiotrophe, c'est-à-dire pourrait effectuer sa croissance dans un milieu minéral (aliment azoté : chlorhydrate d'ammonium), l'énergie nécessaire aux synthèses

étant fournie par l'oxydation de NH_4 en NO_3 . Loefer (1934) n'a pas réussi à reproduire les expériences de Mast et Pace. Nous examinerons prochainement, dans un travail séparé, la question de la chimiotrophie de *Chilomonas paramæcium*, travail où sera étudiée également en détail la nutrition carbonée de cet organisme.

D'après Loefer, *Chilomonas paramæcium* se multiplie parfaitement en milieu peptoné. Dans un tel milieu, les sels des acides acétique, propionique, butyrique, isobutyrique, valériannique et caproïque ont une action favorisante très nette sur le développement des cultures (Loefer 1933).

Nous avons isolé une souche de *Chilomonas paramæcium* à partir d'un seul individu lavé dans des solutions stériles, et nous avons pu constater que, dans les milieux à base de peptone de soie, l'amidon exerçait une action favorisante sur la culture, laquelle action, quoique moins marquée que celle de l'acide acétique, est cependant extrêmement nette.

Nous avons constaté que les acides lactique et pyruvique favorisaient également le développement des cultures et que les acides tartrique et citrique, le glucose, le galactose, le lévulose, le saccharose, le lactose, le maltose, l'arabinose et le xylose étaient sans action. Les acides gras inférieurs exercent donc une action très nette sur *Chilomonas paramæcium* (Loefer, 1933). Les acides pyruvique et lactique, ainsi que l'amidon, possèdent également une action favorisante.

DISCUSSION.

Les nouvelles expériences que nous venons d'exposer montrent que, pour la nutrition carbonée de *Polytoma uvella* comme pour celle de la race blanche d'*Euglena gracilis*, l'amidon peut remplacer les acides gras qui, à l'exclusion des autres acides appartenant aux séries les plus variées et des glucides, peuvent seuls assurer la nutrition carbonée de ces flagellés. Le fait que l'amidon peut seul remplacer les acides gras inférieurs vient à l'appui de la conception, émise par l'un de nous, de l'acide acétique envisagé comme l'un des termes secondaires de l'assimilation chlorophyllienne. C'est à partir des acides gras inférieurs que se formeraient, d'une part, les

réserves lipidiques, d'autre part, les réserves glucidiques figurées, hypothèse qui explique le fait que l'amidon peut remplacer les acides gras inférieurs.

Les leucophytes, qui possèdent un leucoplaste et font la synthèse de l'amidon, constituent pour l'étude de l'amylogenèse un matériel d'étude extrêmement précieux puisqu'un des facteurs, toujours présent chez la très grande majorité des végétaux, la chlorophylle, fait chez eux défaut.

Polytoma uvella possède un plaste réticulé (Volkonsky, 1930), et *Euglena gracilis*, à l'obscurité, conserve ses plastes dépourvus de chlorophylle. D'autre part (voir A. Lwoff, 1932), aucun des Protozoaires (dépourvus de plastes, donc de chlorophylle), ciliés, flagellés, amibes, aucune bactérie, aucun champignon, levure ou moisissure, n'a besoin d'un aliment carboné indépendant si l'aliment azoté fourni est organique. Enfin, aux organismes verts, qui conservent leur chlorophylle à l'obscurité, un aliment carboné organique indépendant n'est pas non plus nécessaire si l'aliment azoté est organique. C'est cet ensemble de faits qui a conduit à définir par le terme d'« oxytrophie » (A. Lwoff, 1932) l'état physiologique défini par la nécessité, en plus de l'aliment azoté organique, d'un aliment carboné indépendant. L'oxytrophie, d'autre part, ne se rencontre que chez les organismes possédant un leucoplaste. D'où la conclusion : l'oxytrophie est liée à la présence d'un plaste et à l'absence de chlorophylle.

Le cas de *Chilomonas paramæcium* et celui d'*Astasia Chattoni* montrent cependant que tous les leucophytes ne sont pas oxytrophes. Ces deux flagellés se multiplient abondamment dans les solutions de peptone de viande, très faiblement dans les milieux à la soie hydrolysée. Et, dans ces milieux, les acides gras, et, de même, les acides lactique et pyruvique ainsi que l'amidon, exercent une action favorisante considérable, alors que les autres corps carbonés organiques sont sans action. (Nous rappelons que l'acide acétique favorise également le développement à l'obscurité des cultures de *Chlamydomonas aglaëformis* et d'*Hæmatococcus pluvialis*, cultivés dans un milieu à base d'asparagine). [M. et A. Lwoff 1929.]

A des organismes tels qu'*Astasia Chattoni* et *Chilomonas paramæcium*, le terme d'oxytrophe ne saurait être appliqué.

Cependant, dans les conditions où les synthèses à réaliser sont élevées (nutrition aux dépens d'un protide incomplet : soie), les aliments carbonés organiques (acides acétique, lactique, pyruvique, amidon) exercent une action favorisante considérable. On peut même se demander si, lorsqu'on aura réalisé le mélange minimum d'acides aminés indispensables pour la nutrition azotée, c'est-à-dire dans les conditions où l'organisme doit effectuer le maximum de synthèses, l'aliment carboné organique ne se montrera pas indispensable.

Quoi qu'il en soit, *Astasia Chattoni* et *Chilomonas paramecium* ne sont pas oxytrophes si l'on définit, comme nous l'avons fait, l'oxytrophie par le caractère indispensable de l'aliment carboné organique. Cependant, il y a entre la nutrition carbonée de ces deux flagellés et celle des oxytrophes trop d'analogie évidente (il s'agit toujours d'organismes dépourvus de chlorophylle et faisant la synthèse d'amidon ou de paramylon), pour que nous les séparions des oxytrophes. Nous proposons de les appeler « paroxytrophes ».

La paroxytrophie définira la condition physiologique des leucophytes pour lesquels un aliment carboné organique n'est pas indispensable, mais pour lesquels, dans les conditions maxima de synthèse, ces aliments carbonés organiques exercent une action favorisante.

L'action des acides gras inférieurs et de l'amidon sur la croissance des organismes à chlorophylle n'a pas été étudiée de façon systématique. On peut prévoir que cette action doit être importante et que les acides gras doivent pouvoir, pour les Métaphytes comme pour les Protophytes, suppléer à la fonction chlorophyllienne. Nous rappelons que les acides gras inférieurs sont sans action sur la multiplication des organismes sans plastides — protozoaires, bactéries, champignons — ou bien que si une telle action existe, elle ne présente aucune spécificité. L'oxytrophie, nécessité d'un aliment carboné organique indépendant, qui doit être un acide gras inférieur ou l'amidon, est donc l'apanage exclusif des organismes possédant un leucoplaste. Nous avons vu que tous les leucophytes ne sont pas obligatoirement oxytrophes, mais les acides gras inférieurs présentent une action manifeste sur leur multiplication, à tel point que, dans l'état actuel de nos connaissances, l'action

favorisante des acides gras inférieurs sur la multiplication d'un microorganisme peut être considérée comme une importante présomption en faveur de la présence de plastes, puisque des acides gras inférieurs ne sont pas des aliments organiques énergétiques banaux, mais *représentent des aliments spécifiques des plastes*. On peut prévoir que lorsqu'on connaîtra les produits intermédiaires entre l'acide acétique et l'amidon, ceux-ci pourront également remplacer l'acide acétique pour la nutrition carbonée des leucophytes.

*
* *

Il a été démontré par Trager (1934) que *Trichomonas termopsidis* a besoin, en plus de l'aliment azoté (sérum + bactéries), de cellulose. D'après notre définition, ce *Trichomonas* serait oxytrophe et, les *Trichomonas* étant dépourvus de plaste, on pourrait opposer cet exemple à notre conception de l'oxytrophie liée au plaste.

Le *Trichomonas termopsidis* est un organisme adapté à un milieu (tube digestif des Termites) qui renferme d'une manière constante de la cellulose. Cette cellulose, le flagellé l'absorbe et l'utilise grâce à une cellulase mise en évidence par Trager (1932). Il ne saurait être question, pour le *Trichomonas*, de réaliser la synthèse de la cellulose à partir de corps simples et on doit considérer le flagellé comme s'étant habitué à tirer son énergie uniquement de l'oxydation de la cellulose et ayant perdu le pouvoir, que possèdent les autres *Trichomonas* étudiés jusqu'ici, d'emprunter leur énergie à l'oxydation d'aliments banaux : *Trichomonas* du gecko, E. Chatton, 1918; *Trichomonas* du pigeon, A. Bos, 1933; *Trichomonas* de la vache, J. Witte, 1933, et même, d'après Trager (1934), un *Trichomonas* non encore identifié d'un termite (1).

D'après Trager, ni l'amidon de riz, ni la dextrine, ni l'inuline, ni le glycogène, ni la cellobiose, ni l'agar, ni le triacétate de cellulose, ni l'octoacétate de cellobiose, ne peuvent remplacer

(1) Nous noterons que notre explication de l'origine de l'oxytrophie est en parfait accord avec la conception de Schoen (1931), d'après laquelle les spécificités fonctionnelles sont dues à des déficiences ou à des pertes d'une partie de l'appareillage catalytique cellulaire.

la cellulose pour la nutrition carbonée de *Trichomonas termopsidis*.

Nous avons, ici, un exemple de ce que nous pouvons appeler une *oxytrophie secondaire*, c'est-à-dire manifestée par un organisme secondairement adapté (1), spécialisé, dont le métabolisme est lié à un aliment carboné *exogène* : la cellulose. Il est bien évident qu'on peut prévoir pour ces oxytrophies secondaires toutes sortes de modalités suivant que l'organisme sera adapté à telle ou telle substance.

Au contraire, les leucophytes oxytrophes stricts ne peuvent vivre sans un corps endogène, l'amidon, dont ils font eux-mêmes la synthèse, synthèse réalisée primitivement par le plaste à partir des produits de l'assimilation chlorophyllienne, et, actuellement, après disparition de la chlorophylle, à partir d'acides gras inférieurs. Il s'agit donc d'une *oxytrophie primaire*.

Notre conception de l'oxytrophie ne s'applique naturellement qu'à l'*oxytrophie primaire vraie*.

CONCLUSIONS.

Nos conclusions de 1932 : l'oxytrophie est liée à la présence d'un plaste et à l'absence de chlorophylle ; les acides gras inférieurs doivent être considérés comme les aliments électifs du plaste, se trouvent donc confirmées. La seconde proposition est démontrée par le fait que, pour les oxytrophes stricts, l'amidon peut remplacer les acides gras inférieurs.

A côté des oxytrophes stricts, nous sommes amenés à distinguer des organismes physiologiquement très voisins — également des leucophytes — moins étroitement spécialisés que les oxytrophes, comme le montre l'étude de leur nutrition carbonée (possibilité d'utilisation des acides lactique et pyruvique), et auxquels un aliment carboné organique n'est pas indispensable : *paroxytrophes*.

Enfin, nous montrons qu'à côté des *oxytrophes primaires vrais*, organismes ayant perdu la fonction chlorophyllienne et auxquels un corps carboné endogène — dont ils effectuent la synthèse à partir de corps organiques simples — est nécessaire,

(1) Nous employons le mot adapté dans son sens étymologique de « attaché ».

existent des *oxytrophes secondaires*, organismes dont le métabolisme est secondairement et spécifiquement lié à un *aliment carboné exogène* dont ils sont incapables de réaliser la synthèse.

TRAVAUX CITÉS

- BOS (A.). *Zentralbl. f. Bakt. I*, **126**, 1932, p. 550 et **130**, 1933, p. 220.
 CHATTON (E.). *C. R. Soc. Biol.*, **81**, 1918, p. 343, 346, 714 et 774.
 DUSI (H.). *Ces Annales*, **50**, 1933, p. 550 et 840.
 GLASER et CORIA. *Journ. Exp. Med.*, **51**, 1930, p. 787.
 LOEFER. *Anatomical Record*, **57**, 1933, p. 95.
 LWOFF (A.). *Recherches biochimiques sur la nutrition des Protozoaires*. Paris, Masson, édit., 1932.
 LWOFF (A.) et DUSI (H.). *C. R. Soc. Biol.*, **107**, 1931, p. 1068.
 LWOFF (A. et M.). *C. R. Soc. Biol.*, **101**, 1929, p. 569 et **105**, 1930, p. 454.
 MAST et PACE. *Protoplasma*, **20**, 1933, p. 326.
 PRINGSHEIM (E. G.). *Beil. z. Allg. Bot.*, **2**, 1921, p. 88.
 PRINGSHEIM (E. G.). *Planta Ark. f. wiss. Bot.*, **22**, 1934, p. 146.
 SCHOEN (M.). *Ces Annales*, **47**, 1931, p. 690.
 TRAGER (W.). *Bioch. Journ.*, **26**, 1932, p. 1762. *Biol. Bull.*, **66**, 1934, p. 182.
 VOLKONSKY (M.). *C. R. Soc. Biol.*, **105**, 1930, p. 619, 624 et 680.
 WITTE (J.). *Zentralbl. f. Bakt. I.*, **128**, 1933, p. 188.

APPENDICE

par A. LWOFF.

Il vient de paraître dans *Planta, Arkiv für wissenschaftliche Botanik*, un travail de Ernst G. Pringsheim intitulé « Ueber Oxytrophie bei Chlorogonium ». Dans ce travail, le fait que *Chlorogonium euchlorum* peut être entretenu à l'obscurité dans un milieu renfermant un sel d'ammonium et de l'acide acétique est cité comme allant à l'encontre de ma conception de l'oxytrophie.

On ne pourrait dire de *Chlorogonium euchlorum* qu'il est oxytrophe que si l'on démontrait qu'il a besoin, à l'obscurité — en plus d'un aliment azoté organique — d'un aliment carboné organique. Or, les expériences nécessaires à la production de cette affirmation n'ont pas été faites et il me semble que E. G. Pringsheim donne, au terme d'oxytrophie, un sens très différent de ceux de ma définition originale (1932, p. 113).

De plus, E. G. Pringsheim reproche à ma théorie de l'oxy-

trophie de n'être fondée que sur le seul exemple de *Polytoma*. E. G. Pringsheim ne tient pas compte d'*Euglena gracilis*. D'ailleurs, mes conclusions sont fondées non pas seulement sur l'étude de ces deux flagellés, mais sur les données fournies par l'étude comparative de la nutrition de très nombreux organismes : protozoaires, protophytes (chlorophytes et leucophytes), bactéries, champignons (levures et moisissures).

Si même, en 1932, au moment où j'ai établi ma théorie de l'oxytrophie, je n'avais eu que le seul exemple de *Polytoma uvella* comme organisme oxytrophe, je n'en aurais pas moins essayé de formuler une relation entre la présence du leucoplaste et la synthèse de l'amidon d'une part, et l'oxytrophie d'autre part. Je rappelle que j'avais un deuxième exemple d'organisme expérimentalement rendu oxytrophe : *Euglena gracilis* décolorée, à l'obscurité.

Deux attitudes étaient alors possibles : 1° enregistrer les résultats de l'expérience, c'est ce qu'a fait Pringsheim en 1921, dans son beau mémoire sur la nutrition de *Polytoma*, à une époque d'ailleurs où l'état de nos connaissances sur la nutrition des Protozoaires permettait difficilement l'élaboration d'une synthèse ; 2° essayer d'établir, dans le cadre d'un système général relatif à la nutrition des microorganismes, les corrélations entre la synthèse de l'amidon par le plaste blanc et la nécessité d'un acide gras inférieur. C'est ce que j'ai tenté de faire, et de cette tentative est née cette théorie de l'oxytrophie dans laquelle E. G. Pringsheim ne veut voir qu'une hypothèse de travail. Je serais déjà heureux si le seul mérite de cette « hypothèse » pouvait être de susciter de nouvelles recherches dans le domaine encore bien peu exploré de la nutrition des organismes intermédiaires entre végétaux et animaux. Mais je me vois contraint de me demander, examinant aussi impartialement que possible les résultats apportés dans le mémoire qui précède, si, après tout, ma conception de l'oxytrophie ne correspondrait pas vraiment à la réalité des faits.

APPLICATION DE LA MÉTHODE DES CULTURES DE TISSUS A L'ÉTUDE DU TYPHUS EXANTHÉMATIQUE

V (1). — NOUVELLES EXPÉRIENCES DE CULTURE DU VIRUS DU TYPHUS EXANTHÉMATIQUE PAR DE NOUVEAUX PROCÉDÉS

par A. A. KRONTOWSKY, M. C. JAZIMIRSKA-KRONTOWSKA,
H. P. SAVITSKA et P. L. SOLITERMAN.

(*Institut bactériologique de Kieff. Service de médecine
expérimentale.*)

Tous les essais effectués depuis près de cinquante ans en vue d'obtenir des cultures pures de l'agent pathogène du typhus exanthématique sont restés infructueux. Ce n'est que lorsqu'on appliqua à ces recherches la méthode des cultures de tissus hors de l'organisme que l'on commença à enregistrer des résultats intéressants. Les premières expériences faites avec succès furent celles de Krontowsky et de Hach et, indépendamment, celles de Kuczynsky (2).

Après que Krontowsky et Hach, en 1921-1923, et Kuczynsky en 1921-1923, eurent déclaré que le virus du typhus exanthématique peut vivre et conserver sa virulence dans les cultures de tissus, apparurent les travaux de Wollbach et de Schläsinger (1923) sur la culture du virus d'un typhus spécial qui se rencontre dans les Montagnes Rocheuses de l'Amérique, ceux de Hoshizaki (1932) sur la culture du virus du typhus endémique de Mandchourie et ceux de nombreux auteurs sur la culture de *Rickettsia* [Nigg et Landsteiner (1932), Pinkerton et Hass (1931) et d'autres].

(1) Pour les travaux antérieurs de I à IV, voir *Münch. med. Wschr.*, n° 5, 1923; *Kl. Wschr.*, n° 36, 1924; *Arch. exp. Zellforsch.*, 3, 1926, p. 297; *Zeitschr. Immunitätsforsch.*, 54, 1928, p. 237.

(2) Les expériences antérieures de Kuczynsky et nombre de ses expériences récentes sur ce sujet n'ont pas été confirmées (Abe 1924 et autres).

Comme dans toutes les expériences précédentes faites tant par l'un de nous (Krontowsky et Hach) que par d'autres [Sato (1931), Yu (1932)], des tissus étaient employés, qui contenaient le virus; celui-ci se trouvait donc en union étroite avec les cellules. Il nous a semblé intéressant d'obtenir, dans les cultures de tissus, une culture du virus du typhus exanthématique par infection d'un tissu normal, sain, *in vitro*.

Dans ce but, le plasma du sang d'un cobaye atteint de typhus a été employé à une dose inférieure à la dose infectante pour le cobaye, afin de pouvoir observer dans les cultures la multiplication du virus.

MÉTHODE DE RECHERCHES.

a) *Virus*. — Nous avons employé deux souches O et B. La souche « O », entretenue depuis quatre ans dans le service épidémiologique de notre Institut, donne chez le cobaye une courbe thermique caractéristique et des lésions bien définies. La souche « B » nous fut aimablement procurée par M. le professeur Barykine, à qui nous exprimons nos remerciements.

b) *Matériaux employés pour les cultures*. — Dans la première série d'expériences, on employa pour la culture une couche de leucocytes d'un cobaye sain, obtenue du sang centrifugé avec de l'héparine.

Dans la deuxième série, on se servit de la membrane de Descemet de l'œil d'un lapin sain : une partie de la cornée fut excisée et placée dans une boîte de Petri; la membrane de Descemet fut séparée avec des pinces et découpée en fragments d'environ 1 millimètre carré.

Dans la troisième série d'expériences, nous avons employé une couche de cellules d'un exsudat provoqué expérimentalement dans la cavité péritonéale d'un cobaye sain. On injectait dans la cavité péritonéale 40 cent. cubes de bouillon peptoné ou de bouillon Martin et 20 cent. cubes d'une solution de Ringer. Le lendemain, on sacrifiait le cobaye; l'exsudat péritonéal était prélevé avec une pipette et centrifugé; le liquide transparent était aspiré et, au dépôt cellulaire rassemblé au fond du tube, on ajoutait un extrait tissulaire avec un peu de plasma d'un cobaye sain pour obtenir un caillot ferme. Ensuite

on opérait selon les règles habituelles, comme pour les leucocytes.

c) *Préparation des cultures.* — Afin de prouver la multiplication du virus et l'infection des cellules saines *in vitro*, on préparait les cultures de la manière suivante. Comme matériel infecté, on prenait le plasma du sang d'un cobaye malade de typhus exanthématique; le troisième ou quatrième jour de l'accès fébrile, on prélevait du sang par ponction du cœur, on en versait 5 cent. cubes dans un tube centrifugeur contenant 0 c. c. 2 d'héparine à 1 p. 1.000, et on centrifugeait à la vitesse de 4.000 tours pendant quinze minutes pour éliminer les éléments cellulaires. Une partie de ce plasma de cobaye malade était mélangé, dans un tube paraffiné, avec trois parties de plasma d'un cobaye sain obtenu de la même manière. Les cultures étaient préparées en gouttes pendantes sur mica; on y transportait une goutte de ce plasma dilué au $\frac{1}{4}$ et, à cette goutte, on ajoutait un fragment de la couche leucocytaire, des cellules d'exsudat ou de la membrane de Descemet; on y ajoutait ensuite une goutte d'extrait soit d'embryon de poulet, soit de la rate d'un cobaye sain. Le plasma contenant le virus du typhus exanthématique était ainsi dilué dans la proportion de $\frac{1}{8}$, ce qui donnait une dose moindre que la dose infectante pour un cobaye.

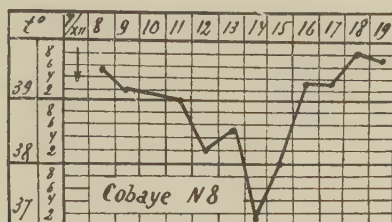
Si, immédiatement après la préparation, on coupait des fragments de la culture de tissus ainsi préparée et si l'on inoculait deux de ces fragments dans la cavité péritonéale d'un cobaye, celui-ci ne réagissait pas. Pour le contrôle, on employait des cultures de fragments de tissus ou de cellules soumises à l'ébullition, ou bien un milieu sans fragments. Les cultures étaient préparées d'après les règles habituelles et placées à l'étuve à 37° pendant cinq ou sept jours, après quoi elles servaient par 2 ou par 4 pour l'inoculation.

INOCULATION AUX ANIMAUX.

En général, nous nous sommes efforcés d'inoculer, avec chaque série de cultures, 2 cobayes et toujours dans la cavité péritonéale.

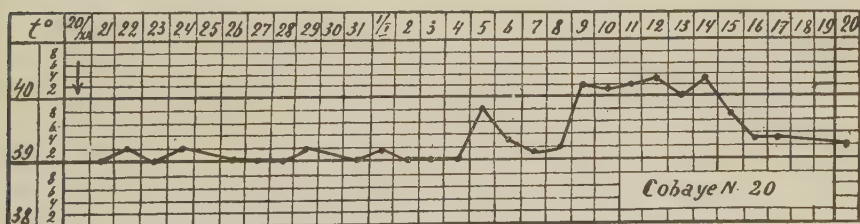
Nous gardions l'un des cobayes jusqu'à la fin de la fièvre,

afin d'avoir une courbe thermique complète et surtout pour que, après avoir sacrifié l'animal, nous pussions faire l'examen histologique de ses organes. Avec les organes de l'autre animal, sacrifié au troisième-quatrième jour de sa fièvre, nous inocu-



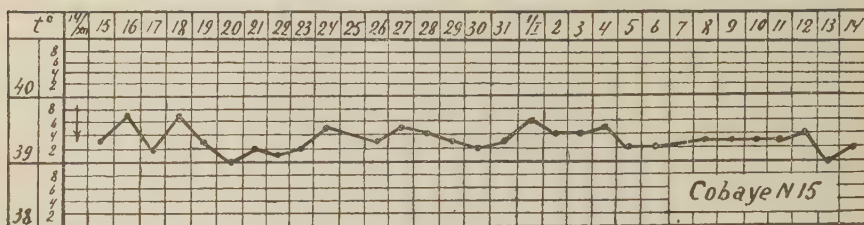
lions (passages) 2 autres cobayes, et ainsi de suite. Lorsque la maladie était terminée, une partie des sujets étaient soumis à l'examen anatomo-histologique.

Dans la première série d'expériences, effectuée avec des leucocytes d'un cobaye sain, nous avons inoculé soit 4 fragments, soit 2 fragments provenant de cultures préparées, soit enfin des cultures ayant séjourné cinq jours à l'étuve. Dans cette série d'expériences, 53 cobayes furent inoculés. A titre d'exemple, nous donnons ici la courbe thermique du cobaye n° 8 inoculé avec 4 fragments provenant d'un milieu ayant séjourné



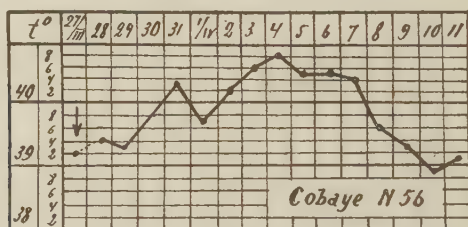
cinq jours à l'étuve. Comme on le voit sur cette courbe, la période d'incubation a été de huit jours. Le deuxième jour de la fièvre, le cobaye fut sacrifié, et, avec l'émulsion de ses organes, on inocula 2 autres cobayes (nos 19 et 20). Ces deux animaux tombèrent malades (courbe n° 20). L'étude histologique des organes du cobaye n° 20 (foie, cerveau) permit de déceler les nodules caractéristiques du typhus exanthématique.

Il faut faire remarquer que l'inoculation intrapéritonéale de 4 fragments de mêmes dimensions, découpés dans le même

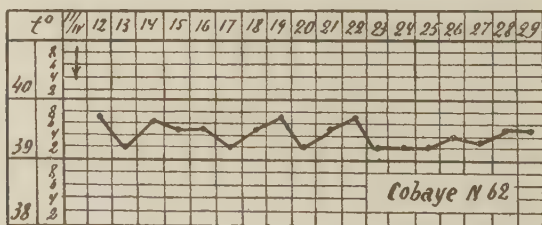


milieu ne contenant pas de fragments de tissus et ayant de même séjourné pendant cinq jours à l'étuve, ne provoqua pas la maladie chez le cobaye (courbe n° 15).

Dans la deuxième série d'expériences avec la membrane de

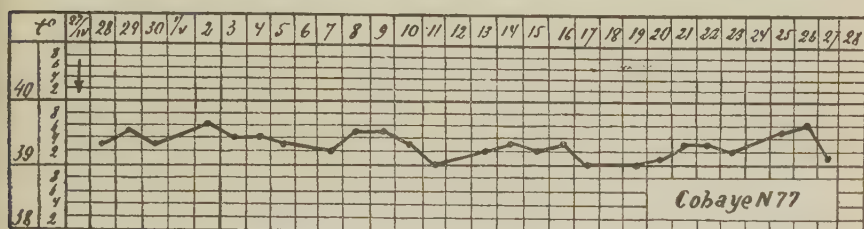


Descemet, 12 cobayes furent inoculés. Nous donnons la courbe thermique du cobaye n° 56 inoculé avec 2 fragments de membrane de Descemet qui avait donné une bonne croissance après sept jours à l'étuve, et celle du cobaye n° 62 (contrôle)

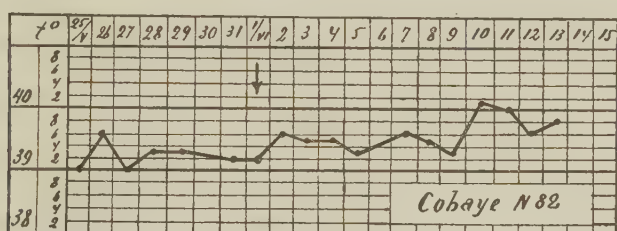


inoculé avec 2 fragments de membrane de Descemet préalablement bouillie; ces cultures avaient également séjourné sept

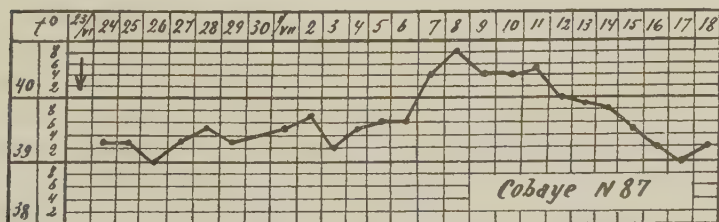
jours à l'étuve. Le cobaye n° 56 (courbe) présenta une fièvre typique vers la fin de laquelle il fut sacrifié. Dans le foie et



dans le cerveau, présence de nodules caractéristiques; dans le cerveau, forte hyperémie des capillaires avec desquamation de l'endothélium et thrombose par places; œdème prononcé de la substance cérébrale avec forte distension des régions péri-



vasculaires. Neuronophagie prononcée et largement répandue. Dans les cellules ganglionnaires des différentes parties du cerveau, excentricité du noyau, effacement du dessin nucléaire et de ses contours, suivi de la destruction complète des cellules.



Chez le cobaye témoin n° 62, aucun changement histologique ne fut observé.

Dans la troisième série d'expériences, qui porta sur 33 cobayes, on prit pour cultures les cellules de l'exsudat péritonéal. Comme dans les séries précédentes, on inocula 2 cobayes pour chaque expérience. On inocula des fragments de cultures ayant séjourné à l'étuve à 37° pendant sept jours et dont la croissance était bonne. Une partie des cobayes de contrôle furent inoculés avec des fragments tués par ébullition (dans le même milieu) et ayant séjourné pendant sept jours à l'étuve. Le milieu contenait également 1/8 de plasma de cobaye infecté. D'après les courbes, on voit que le cobaye n° 77, inoculé avec des fragments de tissus bouillis, resta sain, alors que le cobaye n° 82, inoculé avec des cultures en bonne croissance, donna une infection nette. Le cobaye n° 82 fut sacrifié. L'émulsion de ses organes fut inoculée aux cobayes n°s 83 et 84 qui donnèrent la courbe caractéristique.

Un nouveau passage, le onzième, fut fait du cobaye n° 84 aux cobayes n°s 87 (v. la courbe) et 88; tous deux donnèrent une courbe thermique caractéristique et présentèrent des lésions typiques.

DISCUSSION.

Notre procédé de culture du virus du typhus exanthématique permet d'obtenir non seulement la multiplication du virus dans les cultures des tissus, *mais aussi l'infection du tissu normal in vitro*. Deux ou quatre fragments découpés de cultures récemment préparées, et introduits dans la cavité péritonéale du cobaye, n'entraînent jamais l'infection, tandis que l'inoculation de fragments de tissu ayant séjourné cinq à sept jours à l'étuve la provoquent toujours. Cette infection est quelquefois inapparente, mais au cours des passages ultérieurs les cobayes présentent une fièvre typique et un tableau anatomo-pathologique caractéristique du typhus exanthématique. Les essais de cultures pures d'un typhus particulier des Montagnes Rocheuses, effectués par Breinl en 1933 d'après une autre méthode (méthode H. et M. Maitland), prouvent également que la multiplication du virus du typhus exanthématique se produit surtout dans les tissus. En outre, comme nous l'avons montré plus haut, il est indispensable d'opérer avec des cellules et des tissus vivants, car dans les expériences où le tissu a été tué par

ébullition (Steinhard et Lambert [1914], Krontowsky [1928], Haagen [1933] et autres), il ne s'est produit ni multiplication du virus, ni infection du tissu (courbe cobaye n° 62). Pour obtenir la multiplication du virus en général et du virus du typhus exanthématique en particulier, les signes extérieurs d'activité (croissance) ne sont pas indispensables : ainsi, dans les expériences de Krontowsky et de Hach (1924) — inoculation de la rate d'un sujet atteint de typhus exanthématique, alors que la croissance *in vitro* avait été arrêtée par l'addition au milieu de cytotoxines spécifiques — le virus restait vivant et les cobayes furent infectés. Dans ces cultures en apparence privées de vie, les cellules conservaient une vitalité certaine : les cellules réticulaires de la rate du fragment augmentaient de volume et se transformaient en macrophages hypertrophiés (polyblastes). Comme l'ont montré les expériences de Spassky, en 1932, ces fragments manifestaient un métabolisme très notable. Il ressort de récentes expériences que le métabolisme est indispensable et ne doit pas être trop affaibli. Des recherches ultérieures permettront de préciser ses relations avec la vie des divers virus.

La culture des virus ne se produit donc en général qu'en présence de cellules vivantes (1), biotropisme (Hauduroy 1929), cytotropisme (Rivers 1932) et biocytophilie (Krontowsky), qu'il s'agisse de cultures de tissus classiques ou de cultures simplifiées, dans la solution de Tyrode, avec de petits fragments de tissu (H. et M. Maitland 1928; Krontowsky, Jazimirska-Krontowska et Savitska 1933, Breinl 1933 et autres).

Jusqu'à présent on a abordé une minime partie seulement des questions qui peuvent être résolues grâce aux différentes méthodes de cultures de tissus. Bien que les travaux cités au cours de ce travail et nos propres expériences aient montré que, pour réussir la culture des virus, les cellules et les tissus

(1) Toutes les cellules vivantes ne conviennent pas à la culture d'un virus défini (v. Carrel 1926, Rivers 1932, et d'autres); par exemple la culture du virus aphteux réussit dans un milieu qui contient du tissu de cobaye et non de l'embryon de poule (H. et M. Maitland 1932). Les expériences sur la culture des virus à l'aide de cellules vivantes végétales, par exemple des cellules de levures ou de divers protozoaires, ont donné des résultats négatifs (Breinl 1933, Nicolau et Lwoff 1932 et d'autres). La communication de Zilbert et de ses élèves (Dosser et Wostrouchowa 1933) sur la possibilité de cultiver le virus de la vaccine et du typhus exanthématique avec des levures et certaines bactéries est en contradiction avec ces faits.

vivants soient nécessaires, on n'a pas étudié, jusqu'à présent, le genre de cellules et dans quel état physiologique elles sont le plus favorables pour chaque virus. De larges horizons s'ouvrent pour de nouvelles études sur les virus, dont la vie, la multiplication et l'activité se caractérisent surtout par leur liaison étroite avec les cellules et les tissus vivants.

Conclusions.

1° Une nouvelle méthode est donnée pour la culture du virus du typhus exanthématique au moyen de cultures de tissus. Cette méthode consiste dans l'emploi de quantités minimales de plasma de cobaye infecté, de façon que la culture de tissu contienne une quantité de virus inférieure à une dose infectante minimale.

2° Les cellules et les tissus provenant d'un animal sain, transplantés sur le milieu ainsi additionné de virus, s'infectent *in vitro*.

3° L'inoculation de ces cultures de tissus ayant subi pendant un temps déterminé (cinq à sept jours) un développement hors de l'organisme peut provoquer chez les cobayes un typhus exanthématique typique. Les passages ultérieurs sur les cobayes donnent des résultats positifs. Ceci prouve qu'il y a multiplication de l'agent pathogène, puisque la quantité de virus ajoutée à la première culture était inférieure à la dose infectante.

4° La vie et la prolifération du virus du typhus exanthématique ne sont possibles que lorsque le milieu contient des cellules ou des tissus vivants. En présence de cellules ou de tissus morts, le virus ne se développe pas; il meurt ou s'affaiblit.

Les cultures en cellules ou tissus tués par ébullition ne provoquent pas l'infection.

BIBLIOGRAPHIE

- ABE (T.). *Zbl. f. Bakter. Orig.*, **91**, 1924, p. 217.
BREINL (F.). *Zbl. f. Bakt. Orig.*, **127**, 1933, p. 308, 310, 316.
CARREL (A.). *Journ. exp. Med.*, **43**, 1926, p. 647.

- CARREL (A.) et RIVERS (Th.). *C. R. Soc. Biol.*, **96**, 1927, p. 348.
- HAAGEN (E.). *Zbl. f. Bakter. Orig.*, **129**, 1933, p. 237.
- HAUDUBOY (P.). *Les ultravirus et les formes filtrantes des microbes*, Paris 1929.
- HOSHIZAKI (S.). *Zbl. f. Bakter. Ref.*, **108**, 1932, p. 208.
- KRONTOWSKY (A.). *Erg. d. Physiol.*, **26**, 1928, p. 370.
- KRONTOWSKY (A.) et HACH (I.). *Munch. Med. Wschr.*, n° 5, 1923, p. 144.
- KRONTOWSKY (A.) et HACH (I.). *Klin. Wochenschr.*, n° 36, 1924, p. 1625.
- KRONTOWSKY (A.) et HACH (I.). *Arch. f. exp. Zellforsch.*, **3**, 1926, p. 297.
- KRONTOWSKY (A.) et HACH (I.). *Ztschr. f. Immunitätsforsch.*, **54**, 1928, p. 237.
- KRONTOWSKY (A.), JAZIMIRSKA-KRONTOWSKA (M.) et SAVITSKA (E.). *Wratch. Djelo (russe)*, n° 12, 1933, p. 839.
- KUCZYNSKY (M.). *Virch. Arch.*, **242**, 1923, p. 355.
- MAITLAND (H.) et MAITLAND (M.). *Lancet*, 1928, p. 596.
- MAITLAND (H.) et LAING (A.). *Brit. Journ. exp. Path.*, **11**, 1930, p. 119.
- NICOLAU (A.) et LWOFF (A.). *Bull. Soc. Path. exot.*, **25**, 1932, p. 721.
- NIGG (C.) et LANDSTEINER (K.). *Journ. exp. Med.*, **55**, 1932, p. 563.
- PINKERTON (H.). *Journ. exp. Med.*, **54**, 1931, p. 181-187.
- PINKERTON (H.) et HASS (G.). *Journ. exp. Med.*, **56**, 1932, p. 131, 145, 151.
- PINKERTON (H.) et HASS (G.). *Journ. exp. Med.*, **54**, 1931, p. 307.
- RIVERS (Th.). *Physiol. Reviews*, **12**, 1932, p. 423.
- RIVERS (Th.). *Arch. of Neurol. and Psych.*, **28**, 1932, p. 757.
- SATO. *Deutsch. Wschr.*, n° 21, 1931, p. 892.
- SILBER (L.) et WOSTROUCHOWA (E.). *Sow. Wratch. Revue (russe)* n° 15-16, 1932, p. 923.
- SILBER (L.) et WOSTROUCHOWA (E.). *Revue Microbiol. et Immunol. (russe)*, **9**, 1933, p. 66.
- SILBER (L.) et DOSSER (E.). *Sow. Wratch. Revue (russe)*, n° 15-16, 1933, p. 669.
- SPASSKY (N.). *Ztschr. f. Immunitätsforsch.*, **77**, 1932, p. 365.
- YU *Zbl. f. Bakter. Orig.*, **124**, 1932, p. 181.

RECHERCHES SUR L'IMMUNITÉ NATURELLE DU CHIEN CONTRE LA RAGE ET SUR LES NEUROTOXINES

par DÉMÈTRE JONNESCO.

(*Institut D^r V. Babès. Directeur : Professeur G. Proca, Bucarest.*)

J'exposerai, dans le présent mémoire, les résultats de mes recherches sur l'immunité naturelle du chien contre la rage, sur le passage dans le sang du virus rabique chez un chien réfractaire, sur les neurotoxines et sur la résistance des animaux sensibilisés à l'infection rabique.

I. — Recherches sur l'immunité naturelle contre la rage chez le chien.

Dans la rage, comme dans les autres infections, il peut y avoir, parmi les individus réceptifs, des cas de résistance naturelle. Parmi les animaux sensibles, les uns résistent, exceptionnellement, à l'inoculation du virus rabique par voie subdurale : très rarement le lapin, plus fréquemment le chien. Viaia, à l'Institut Pasteur, n'a rencontré, au cours d'une période de quinze années, qu'une seule lapine qui ait résisté à trois inoculations intracérébrales de virus fixe ; mais les petits de cet animal n'étaient pas immunisés. Pasteur, Hertwig, Renault, Remlinger, Heckenroth décrivent des cas d'immunité naturelle chez le chien. Au cours des passages du virus rabique fixe-chien, que nous effectuons à l'Institut D^r V. Babès, pour la préparation d'un vaccin antirabique pour les animaux, nous avons rencontré 1 p. 100 de cas de résistance naturelle contre la rage chez les chiens inoculés par voie cérébrale.

Le 3 mai, nous avons inoculé à 5 chiens, par voie intraoculaire, du virus rabique renforcé « J » (1). Les résultats obtenus ont été les suivants :

a) 3 chiens, âgés de cinq mois, sont paralysés le 10 mai (au bout de sept jours) et succombent après deux jours de paralysie ;

b) Le quatrième chien, âgé de deux ans, est paralysé le 13 mai (au bout de dix jours) et succombe trois jours après de paralysie ;

c) *Le cinquième chien, âgé de deux ans, résiste à l'inoculation par voie intra-oculaire. Par la suite, cet animal a été l'objet de multiples recherches, puisqu'il fut, depuis, inoculé par voie cérébrale et, par neuf fois, de virus rabique ; il demeura continuellement sain jusqu'au 2 avril 1934, date à laquelle il fut sacrifié.*

Voici le nombre, la date et l'espèce de virus rabique inoculé au cinquième chien résistant à la rage (chien R) :

INOCULATIONS	DATE	VOIE	VIRUS	DILUTIONS
Première . . .	3 mai 1933.	Intraoculaire.	Virus « J ».	1/50
Deuxième . . .	15 juin 1933.	Intracérébrale.	Fixe-chien (1 c. c.).	1/50
Troisième . . .	1 ^{er} août 1933.	Intracérébrale.	Fixe-chien (1 c. c.).	1/50
Quatrième . . .	13 oct. 1933.	Intracérébrale.	Fixe-chien (1 c. c.).	1/50
Cinquième . . .	31 oct. 1933.	Intracérébrale.	Fixe-chien (1 c. c.).	1/50
Sixième . . .	11 déc. 1933.	Intracérébrale.	Fixe-chien (1 c. c.).	1/50
Septième . . .	29 déc. 1933.	Intracérébrale.	Fixe-chien (1 c. c.).	1/50
Huitième . . .	11 janv. 1934.	Intracérébrale.	Fixe-chien (1 c. c.).	1/50
Neuvième . . .	25 janv. 1934.	Intracérébrale.	Fixe-lapin (1 c. c.).	1/50
Dixième . . .	15 fév. 1934.	Intracérébrale.	Fixe-lapin (1 c. c.).	1/50

Le 2 avril 1934, le chien R est sacrifié. On trouve les reins augmentés de volume, de consistance normale. La capsule se décortique aisément, laissant une surface de couleur brun-jaunâtre, avec les étoiles de Verheyen très visibles. Section facile. Corticale augmentée en volume, de couleur brun-rougeâtre-jaunâtre, avec dessin en partie conservé ; glomérules faiblement visibles et vaisseaux hyperémiés ; la limite entre la corticale et la médullaire est bien conservée. Médullaire agrandie

(1) DÉMETRE JONNESCO : Sur un virus rabique des rues à virulence renforcée, *Bull. Acad. Méd.*, 24 mai 1932 ; *Ces Annales*, 49, 1932, ., 435.

dans sa partie externe, sur une largeur de 3 millimètres, de couleur brun-jaunâtre clair et en relief ovalaire; le reste est rose-blanchâtre, gras, de dessin effacé dans la moitié externe.

En différentes régions du cerveau, des vaisseaux sont parfois dilatés, entourés d'un foyer d'infiltration de lymphocytes et de cellules jeunes monocytaires; dans le cœur, dégénérescence grasseuse des fibres musculaires avec nombreuses infiltrations de cellules plasmatiques, lymphocytes et monocytes; dans les reins, dégénérescence parenchymateuse assez avancée avec dégénérescence grasseuse des cellules des tubes.

ETUDE DE LA VALEUR NEUTRALISANTE DU SÉRUM DU CHIEN R.

On mélange avec soin neuf parties d'émulsion cérébrale de virus fixe-lapin (finement broyé et filtré sur gaze), avec une partie de sérum, ce qui fait une dilution au 1/10, et on laisse le mélange vingt-quatre heures à la température du laboratoire, à l'obscurité. On prépare ainsi des dilutions au taux voulu, dont nous prenons 0 c. c. 3 pour les inoculer par voie subdurale ou intracérébrale à des lapins.

Nous avons pu constater que le sérum du chien R, récolté sept jours après la quatrième inoculation intracérébrale de virus rabique, a une valeur neutralisante de 1/10 seulement. Quinze jours après la sixième inoculation, nous avons trouvé une valeur neutralisante de 1/20.

Les lapins doivent être tenus en observation un temps assez prolongé, même quand il s'agit de mélanges avec le virus fixe (l'incubation habituelle du virus rabique fixe-lapin de l'Institut Babès est de cinq jours).

Ainsi, 1 lapin, inoculé par voie intracérébrale avec le virus fixe-lapin mélangé de sérum antirabique au 1/10, le 30 septembre 1933, succombe au bout de vingt et un jours, paralysé (stérilisation partielle). Les passages suivants, toutefois, reproduisent la rage avec incubation habituelle du virus fixe (cinq jours).

RECHERCHES SUR LA PRÉSENCE DU VIRUS RABIQUE CHEZ LE CHIEN R,
APRÈS INOCULATION,
ET SUR LA VALEUR NEUTRALISANTE DU CERVEAU *post mortem*.

Nous avons prélevé un petit fragment de cerveau dans la région temporale du chien R, le 29 novembre 1933, c'est-à-dire vingt-neuf jours après la quatrième inoculation intracérébrale de virus rabique fixe-chien sur l'animal vivant et sain. On inocula, par voie subdurale, à 2 lapins, 0 c. c. 3 d'une émulsion au 1/10 de ce fragment cérébral. Un premier lapin succomba le 14 décembre après être resté trois heures sur le flanc. Les ensemencements des organes de ce lapin dans les milieux aérobies et anaérobies sont demeurés stériles. A partir de ce lapin, on inocula, par voie intracérébrale, 1 cobaye, qui succomba sans paralysie le 14 février 1934. Le second lapin mourut le 28 mars 1934 après une courte paralysie de quatre heures.

Le virus rabique a donc été présent dans le cerveau de ce chien R, le vingt-neuvième jour après l'inoculation intracérébrale. Ce virus avait subi une atténuation puissante, comme cela ressort de la durée excessivement longue de l'incubation.

Des lapins inoculés par voie subdurale, un a succombé au bout de quatre mois et l'autre au bout de quinze jours. On obtint passage positif chez le cobaye après deux mois d'incubation.

La glande sous-maxillaire droite du chien R, extirpée le 17 novembre 1933 (dix-sept jours après la quatrième inoculation intracérébrale de virus rabique fixe-chien) ne s'est pas montrée pathogène pour 2 cobayes et 2 lapins inoculés par voie intracérébrale. Ces animaux sont demeurés sains jusqu'à ce jour.

Une émulsion au 1/10 du cerveau du chien R fut filtrée sur gaze, mélangée par parties égales avec une émulsion fine à 1/100 de virus rabique fixe-lapin, et laissée vingt-quatre heures à la température du laboratoire, à l'obscurité. Nous avons inoculé ce mélange par voie intracérébrale à 2 lapins; tous deux ont été paralysés le troisième jour et ont succombé l'un après quelques heures, l'autre après douze heures. Par conséquent, le cerveau du chien R n'a exercé *in vitro* aucune action neutralisante sur

le virus rabique; au contraire, il semble que sa présence ait abrégé la durée habituelle de l'incubation du virus fixe. La résistance de ce chien à la rage semble due à la destruction ou à l'atténuation du virus seulement au contact de la cellule nerveuse vivante, ou à l'action directe de ses ferments de défense au lieu de l'inoculation, ou encore à l'élimination du virus sous une forme atténuée (voir plus loin l'élimination du virus par le sang).

Les recherches hématologiques faites sur le chien R, ainsi que sur 2 autres chiens réfractaires au virus rabique introduit par voie intracérébrale, nous ont montré un accroissement évident des polynucléaires éosinophiles. Nous avons cherché dans ces 3 cas à éliminer l'action des vers intestinaux en étudiant la présence d'œufs de parasites par le procédé de Teleman.

Chez le chien R, le nombre des éosinophiles a toujours été croissant parallèlement au nombre des inoculations intracérébrales de virus rabique. Quinze jours après la première inoculation intracérébrale, nous trouvons chez le chien R :

Leucocytes par millimètre cube	14.000
Polynucléaires neutrophiles p. 100	78
Métamyélocytes neutrophiles p. 100	1
Polynucléaires éosinophiles p. 100	4
Lymphocytes p. 100	17

Dix-sept jours après la cinquième inoculation intracérébrale de virus rabique, nous trouvons :

Leucocytes par millimètre cube	45.000
Polynucléaires neutrophiles p. 100	80
Métamyélocytes neutrophiles p. 100	2
Polynucléaires éosinophiles p. 100	8
Lymphocytes p. 100	10

Onze jours après la neuvième inoculation intracérébrale de virus rabique, nous trouvons :

Leucocytes par millimètre cube	13.500
Polynucléaires neutrophiles p. 100	64
Polynucléaires éosinophiles p. 100	17
Lymphocytes p. 100	19

Il résulte de ces constatations que, à la suite des inoculations par voie intracérébrale de virus rabique chez le chien réfractaire,

on constate un accroissement du nombre des éosinophiles parallèle au nombre des inoculations.

Bien que je me sois convaincu, au cours de mes recherches, que les éosinophiles *in vitro* n'ont pas d'action neutralisante sur le virus rabique, l'accroissement du nombre de ces éléments trouvés chez le chien ayant une immunité naturelle, ainsi que chez les sujets soumis au traitement antirabique vers le neuvième jour, leur disparition complète (signal d'alarme) deux ou trois jours avant la déclaration de la rage et pendant la durée de la maladie déclarée (1) nous autorise à admettre que la présence en nombre croissant de ces cellules dans le sang constitue un test important dans le processus d'immunité à l'égard de la rage.

II. — Passage du virus rabique dans le sang chez le chien R après inoculation par voie intracérébrale.

A l'occasion de l'étude faite pour mettre en évidence la neurotoxine, nous avons pu constater que le sang du chien R contient le virus rabique pendant huit jours à dater de l'inoculation intracérébrale.

Le sérum du chien R, récolté sept jours après l'inoculation intracérébrale de virus rabique fixe-chien, a été conservé douze jours à la température de 4°, dans l'obscurité, pour détruire son action neurotoxique constatée dans des expériences antérieures sur les cobayes.

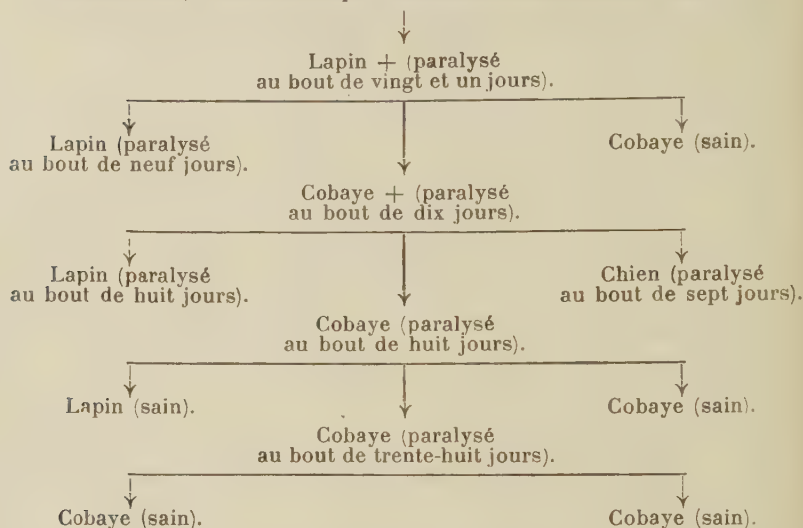
Il a été ensuite inoculé par voie intracérébrale à 1 lapin qui, au bout de vingt et un jours, se paralyse, tombe sur le flanc et meurt après une courte période de paralysie totale (douze heures). Lesensemencements en milieux aérobies et anaérobies du cerveau et du cœur sont demeurés négatifs. Avec l'émulsion cérébrale de ce lapin, nous avons réalisé quatre passages successifs par voie intracérébrale sur des cobayes. Aucun d'eux n'a eu de paralysie de longue durée : l'animal paralysé tombe sur le flanc et succombe au bout de quatre à douze

(1) C. R. Soc. Biol., 97, 1927, p. 983.

NUMÉRO	ESPÈCE animale inoculée	ESPÈCE du sérum neurotoxique	DATE de la sensibilisation au sérum neurotoxique et mode d'inoculation	DATE de l'inoculation intracérébrale de virus fixe lapin	DATE de l'apparition de la paralysie	OBSERVATIONS
1	Cobaye.	Sérum chien anti-cobaye.	3 février 1934, inoculation intracérébrale.	29 avril 1934 à 10 heures du matin.	30 avril à 10 heures du matin.	Paralysé au bout de 24 heures; succombe le lendemain.
2	Idem.	Sérum chien « R ».	9 janvier 1934, inoculation intracérébrale.	Idem.	Au bout de 12 heures.	Paralysé au bout de 12 heures; succombe 6 heures après.
3	Idem.	Idem.	20 décembre 1934, inoculation intracérébrale.	Idem.	1 ^{er} mai 1934 à 5 heures de l'après-midi.	Paralysé au bout de 3 jours et 7 heures; succombe le 4 ^e jour.
4	Idem.	Idem.	Idem.	Idem.	Idem.	Idem.
5	Idem.	Idem.	Idem. Inoculé dans le nerf sciatique gauche arrière.	Idem.	Idem.	Idem.
6	Idem.	Idem.	3 janvier 1934, inoculation intracérébrale.	Idem.	Idem.	Idem.

heures. Le schéma suivant montre les passages du virus d'un animal à l'autre, par voie-intracérébrale :

Sérum du chien R. Sept jours après la quatrième inoculation par voie intracérébrale, de virus rabique fixe-chien conservé douze jours à 4°.



De ces expériences il résulte que, chez un chien possédant l'immunité naturelle, le virus rabique fixe, inoculé par voie intracérébrale, a été trouvé dans le sang le septième jour après l'inoculation, l'animal demeurant sain (1).

Comme on peut le voir sur le tableau des pages précédentes, nous avons inoculé le sérum sanguin du chien R à un lapin qui se paralyse après une incubation de vingt et un jours. A partir de ce lapin, on a inoculé 2 cobayes et 1 lapin : 1 cobaye se paralyse au bout de dix jours, un autre demeure sain et le lapin se paralyse au bout de neuf jours. Dans ce second passage, nous observons un fait qui semble paradoxal : bien que l'incubation s'abaisse à neuf et dix jours et qu'il semble que le virus se soit renforcé, 1 cobaye cependant demeure sauf. Ce fait ne saurait s'expliquer sinon en l'attribuant soit à une diffusion inégale du virus chez le lapin du premier passage, soit à un processus d'autostérilisation ou à une erreur de technique. Au troisième

(1) Nous avons montré que, pendant la maladie déclarée, le virus rabique peut être éliminé par l'urine. *C. R. Soc. Biol.*, 92, 1927.

passage, l'incubation se réduit encore : 1 lapin et 1 cobaye se paralysent le huitième jour, 1 chien le septième jour. Au quatrième passage, toutefois, 1 cobaye et 1 lapin demeurent indemnes et un autre cobaye se paralyse après une incubation prolongée (trente-huit jours), réalisant une infection mortelle autostérilisable, puisque les passages suivants à 2 cobayes sont restés négatifs.

III. — Neurotoxines.

Pour la première fois, en 1900, Delezenne a préparé, par immunisation d'un canard, un sérum neurotoxique spécifique pour le chien.

Centani a obtenu un sérum neurotoxique anti-lapin. Pirone, Baroncini et Giacometti, Armand-Delille, Goldbaum ont repris la question et concluent à la spécificité des neurotoxines. Schmidt a essayé d'obtenir un sérum neurotoxique actif à l'égard des nerfs périphériques. En général, les neurotoxines préparées par les auteurs précités sont des hétéro-toxines.

Rossi aurait réussi à préparer un sérum isoneurotoxique pour le cobaye et le chien.

Première série de recherches. — Le sérum neurotoxique employé avait été préparé par injections sous-cutanées d'émulsions de cerveau de lapin à des lapins. Après dix injections de 1 cent. cube d'une émulsion au 1/10 et une pause de sept jours, nous avons récolté le sérum. Nous avons inoculé 0 c. c. 4 de ce sérum, par voie intracérébrale, à 4 lapins. 2 de ces lapins n'ont présenté aucun symptôme apparent. Le troisième parut abattu dès le second jour, ses pattes tremblaient ainsi que sa tête, surtout quand il tentait de faire un mouvement. Difficulté dans les mouvements, dyspnée. Mort le soir. Lesensemencements provenant du cœur et du cerveau furent négatifs.

Le quatrième lapin présenta, seize jours après l'inoculation, une légère parésie des pattes avec tremblement de la tête et indécision de la marche. Pendant les périodes de repos ou après exécution de mouvements volontaires, le lapin éprouvait le besoin d'appuyer sa tête et le nez entre les pattes antérieures (fig. 1).

Pendant ce temps, l'animal diminuait de poids (200 grammes);

température 39°. Opisthotonos avec conservation de cette position pendant trois à quatre minutes dans un état de catatonie; le reste du temps le lapin appuie son museau sur le plancher de sa cage. C'est dans cet état qu'il succombe, trente-sept jours après l'inoculation.

Seconde série de recherches. — On a inoculé à un chien, sous la peau, du 24 octobre au 12 novembre 1934, 355 cent. cubes au total d'une émulsion cérébrale au 1/10 de lapin. La dernière injection, 20 cent. cubes, a été faite par voie intrapéritonéale. Au bout de sept jours, on a saigné le chien. Son sérum fut inoculé à 7 lapins.

Le premier lapin, inoculé par voie intracérébrale avec 0 c. c. 5, présenta le second jour des tremblements de la tête, de l'indécision de la marche et de la parésie des pattes; il succomba le quatrième jour après l'inoculation.

Le second lapin, inoculé par voie intracérébrale avec 0 c. c. 4, présenta le second jour de la parésie des membres: il culbutait en marchant, gardait longtemps des attitudes fixes, la tête appuyée contre le plancher de sa cage, entre les pattes antérieures. Il succomba cinq jours après l'inoculation avec une perte de poids de 175 grammes.

Le troisième lapin, inoculé par voie intracérébrale, avec 0 c. c. 5, présenta immédiatement des tremblements de la tête qu'il appuyait entre ses pattes antérieures et de la difficulté dans la marche. Il succomba sept jours après l'inoculation.

Le quatrième lapin, inoculé avec 0 c. c. 4 dans le nerf sciatique droit, succomba sept jours après l'inoculation.

Le cinquième lapin, inoculé par voie intrarachidienne avec 0 c. c. 5, demeura indemne.

Le sixième lapin reçut une injection intraveineuse de 1 cent. cube et présenta, au bout de six jours, une paralysie du train postérieur. Il succomba dix-sept jours après l'inoculation.

Le septième lapin, inoculé par voie intra-oculaire avec 0 c. c. 5, demeura indemne.

Sur 7 lapins qui reçurent, par des voies diverses, du sérum neurotoxique chien-lapin, 5 ont donc succombé : 3 (inoculés par voie intracérébrale) au bout de quatre, cinq et sept jours, 1 (inoculé dans le nerf sciatique) au bout de sept jours, 1 (injection intraveineuse) au bout de dix-sept jours.

Troisième série de recherches. — Le chien R a été inoculé pour la sixième fois avec du virus fixe-chien, par voie intracérébrale. Cinq jours après, on inocula par voie intracérébrale, à 4 cobayes et 2 lapins, 0 c. c. 1 de sérum de ce chien. Nous avons observé chez les cobayes, immédiatement après l'inoculation, des tremblements des pattes, respiration accélérée, démangeaisons au museau, agitation très vive, heurts aux parois



FIG. 1. — Attitude d'un lapin inoculé par voie intracérébrale, avec du sérum neurotoxique.

de la cage, opisthotonos. Après de courtes rémissions, survinrent des mouvements de manège, convulsions, spasmes; mort au bout d'une heure et demie, deux, trois et sept heures. A l'autopsie, on constate une hyperémie intense du cerveau dans sa totalité; les reins sont hémorragiques; aspect hyperémique de l'intestin trouvé en contraction très prononcée; urine hémorragique.

Les 2 lapins inoculés en même temps que les cobayes, reviennent à eux après une légère indisposition, et demeurent sains.

Le sérum du chien R, aux septième, huitième, neuvième et dixième jours après la sixième inoculation intracérébrale, produit les mêmes phénomènes chez les cobayes inoculés par voie intracérébrale : inoculé à la dose de 0 c. c. 5 par voie intracardiaque, il provoque toujours la mort foudroyante (dix à quinze minutes).

Le sérum du chien R perd ses propriétés toxiques s'il est conservé à 40°C pendant huit jours. Les phénomènes apparaissent de plus en plus atténués chez les cobayes inoculés par voie intracérébrale après repos de sérum pendant trois jours à 4°. Avec le sérum gardé une semaine à 4°, nous avons rarement observé, chez les cobayes, le tremblement des pattes avec démangeaisons au museau et exceptionnellement la mort au bout de trois ou quatre jours.

Inoculé à un chien, par voie intracérébrale, ce sérum, neurotoxique pour les cobayes, ainsi que le sang total, immédiatement après la saignée, n'ont aucune action nocive. 1 cent. cube de sang total de cobaye intoxiqué par la neurotoxine, injecté par voie intracardiaque à des chiens neufs, aussitôt après la récolte, ne produit aucun symptôme morbide.

La chaleur a une action atténuante et destructive sur cette neurotoxine. *Chauffé au bain-marie pendant dix minutes à 45°, le sérum perd son action nocive.* Chauffé pendant dix minutes à 40° il la conserve. Ainsi, un cobaye inoculé par voie intracérébrale avec 0 c. c. 1 de sérum neurotoxique chauffé à 40° pendant dix minutes présente, au bout de quelques minutes, une vive agitation ; il cherche à grimper sur sa cage comme un jeune chien, se gratte le nez, secoue la tête ; sa respiration s'accélère ; après deux heures de souffrance, il revient à lui et ne présente plus aucun symptôme apparent, mais, au bout de trois jours, soudain il tombe sur le flanc, les pattes tremblantes, ne peut se relever, reste couché jusqu'au lendemain et succombe.

L'adjonction de sérum frais de cobaye au sérum neurotoxique chauffé ou conservé huit jours à 4° ne rétablit pas son action pathogène.

Le pouvoir neurotoxique du sérum du chien R est d'autant plus grand que la saignée a été faite à une date plus rapprochée de celle de l'inoculation intracérébrale.

A partir du septième jour après l'inoculation, le sérum de ce chien n'a plus qu'une très faible action toxique pour les cobayes, lesquels, après une période d'indisposition passagère, demeurent sains la plupart du temps.

L'inoculation intracérébrale à des cobayes du sérum sanguin de 4 chiens normaux n'a produit aucun phénomène morbide apparent.

Pour répondre à l'objection que la neurotoxine du chien R pourrait être attribuée aussi au virus rabique inoculé à cet animal, nous avons inoculé à 2 chiens, par voie intracérébrale, 1 cent. cube d'émulsion au 1/10 de cerveau normal de chien, à six reprises, du 17 janvier au 15 mars 1934. A partir de la troisième inoculation, le sérum sanguin de ces 2 chiens acquit un pouvoir neurotoxique pour les cobayes à peu près égal en intensité à celui du sérum du chien R.

Cette légère différence est peu appréciable et pourrait s'expliquer par ce fait que le cerveau rabique est plus toxique que le cerveau normal. A. Marie a, en effet, montré en 1912, que les substances albuminoïdes du cerveau rabique sont nettement plus toxiques que celles du cerveau normal.

Dans les expériences relatées plus haut, j'ai donc réussi à obtenir une hétéro-neurotoxine pour les cobayes en injectant par voie intracérébrale à un chien soit du cerveau de chien normal, soit du cerveau rabique fixe-chien à un chien R jouissant d'une immunité naturelle contre la rage. Le sérum normal de chien n'a pas d'action neurotoxique sur les cobayes; toutefois, si on répète les injections intracérébrales sur un chien avec du cerveau du chien, on obtient ainsi une toxine très active pour le cobaye. Le cerveau est un organe différencié à un très haut degré dans sa fonction antigénique (Witebsky et Steinfeld); comme l'est aussi le cristallin (Uhlenhuth, Römer, Witebsky) ou les cellules sexuelles (Métalnikov, etc.). Le cerveau peut donc jouer un rôle actif chez le même individu ou chez un animal de la même espèce comme un hétérolipoïde, d'une part en s'éliminant par le sang sous forme de composés de dégradation extrêmement toxiques, d'autre part, en tant

qu'antigène produisant des anticorps de défense (neurotoxines, hémolysines, etc.) pour l'organisme lésé.

On sait que la fonction hémolytique du sérum normal varie selon les individus et les espèces. Le sérum normal de chien a une action hémolytique constante sur les hématies de cobaye. Parallèlement à l'action neurotoxique, le sérum sanguin des chiens inoculés par voie intracérébrale avec du cerveau de chien devient plus hémolytique pour les hématies de cobaye et très peu pour les hématies de lapin. Ce pouvoir hémolytique augmente parallèlement au nombre des inoculations intracébrales.

Si le sérum neurotoxique est conservé huit jours à 4°, ou s'il est chauffé entre 45° et 56° au bain-marie, il perd sa propriété hémolytique, mais il la récupère si l'on y ajoute de l'alexine. Toutefois, tandis que l'action hémolytique, perdue par échauffement ou par vieillissement, reparait par adjonction d'alexine, l'activité neurotoxique une fois perdue ne reparait plus ; le sérum, inoculé par voie intracérébrale au cobaye, devient inoffensif. Ces caractères permettent d'établir une distinction nette entre la propriété neurotoxique due à certaines substances de désagréation protéique complexes, qui s'éliminent par le sang pendant les sept jours qui suivent l'inoculation intracérébrale de cerveau de chien et les hémolysines qui coexistent. De même, nous devons noter l'action intense exercée sur tout l'organisme du cobaye par une injection de 0 c. c. 1 seulement de sérum neurotoxique par voie intracérébrale. Les lésions histopathologiques ainsi produites étaient extrêmement intenses et identiques dans tous les cas qui se sont terminés par la mort. En général, les viscères contenaient des vaisseaux dilatés, gorgés de sang et de nombreuses extravasations sanguines. Le sang avait subi dans tous les cas une hémolyse plus ou moins intense. Les reins, particulièrement, présentaient un aspect hémorragique très marqué, comparable à celui que l'on observe dans les intoxications par le chlorate de potasse. Les glomérules et les tubes rénaux contenaient du sang en abondance ; dans l'urine on a trouvé de nombreux cylindres hématiques.

IV. — Résistance à la rage des animaux sensibilisés au sérum neurotoxique.

A la suite d'inoculations de sérum neurotoxique, 13 cobayes et 4 lapins sont restés indemnes. Ils ont été ensuite infectés par voie intracérébrale avec la même émulsion au 1/100 de virus rabique fixe-lapin de l'Institut V. Babes. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau (p. 670-671) :

Sur 13 cobayes et 4 lapins sensibilisés par injection de neurotoxine, les paralysies, à la suite des inoculations intracérébrales de virus rabique, se manifestent de la manière suivante : chez les cobayes, 3 au bout de douze heures ; 1 après vingt-quatre heures ; 1 après six heures ; 8 après trois jours et sept jours ; chez les 4 lapins, le lendemain.

Ainsi, la substance nerveuse virulente, inoculée par voie intracérébrale avec du virus rabique, se comporte chez les cobayes et les lapins sensibilisés à la neurotoxine comme un poison d'une toxicité extrême.

Le phénomène serait en partie semblable à ce qu'on observe dans la tuberculose. A. Marie et M. Tiffeneau ont, en effet, démontré que la tuberculine injectée par voie cérébrale à des animaux tuberculeux manifeste une toxicité infiniment plus grande que chez les animaux sains. Dans le cas de mes expériences, les phénomènes morbides apparaissent avec une intensité extrême ; les animaux succombent dans certains cas en six, douze ou vingt-quatre heures ; dans d'autres cas, le deuxième ou troisième jour après l'inoculation par voie intracérébrale. Probablement, ce qui contribue au déclenchement des phénomènes paralytiques chez les animaux sensibilisés, c'est, en dehors de la présence du virus rabique, la matière cérébrale inoculée elle-même.

BIBLIOGRAPHIE

1. ARMAND-DELILLE. *Société de Biol.*, 57, 1904 ; *Ces Annales*, 20, 1906.
2. BAIL (O.). *Zeits. f. Imm. Forsch.*, 21, 1914, p. 202.
3. BARONCINI et GIACOMETTI. Cité d'après Louis Bory.
4. BORDET (J.). *Ces Annales*, 15, 1901, p. 303.
5. BORY (Louis). *Les phénomènes de destruction cellulaire*, Masson, 1922.

6. CENTANI. *Riforma Medica*, 4, 1900, p. 374-377.
7. DELEZENNE. *Ces Annales*, 1900, p. 686.
8. ENRIQUEZ et SICARD. *C. R. Soc. de Biol.*, 3 novembre 1900.
9. FORSSMAN (J.). *Handb. d. path. Mikroorg.*, 3, Aufl., 3, 1928, p. 469 ; *W. kl. W.*, n° 20, 1929.
10. FRIEDMANN (U.). *Biochem. Zeits*, 80, 1917, p. 333.
11. GOLDBAUM. *Berlin. Klin. Woch.*, 45, 1908, p. 1803-1808.
12. GRAETZ (F.). *Erbeg. d. Hyg., Bakt., Immt. u. exp. Ther.*, 6, 1924, p. 397.
13. IONESCU-MIHAESTI. Données récentes sur l'hémoagglutination et l'hémolyse du sang humain. *Traité du sang*, 1932, Paris.
14. JACOBTHAL (E.) et SCHUBACH (A.). Morphologie und Serologie des Nomalblutes der Laboratoriumstiere. *Handb. d. pathog. Mikroorg.*, 3, Aufl., 3, 1928, p. 333.
15. JONNESCO DÉMÈTRE. *C. R. Soc. Biol.*, 63, 1933, p. 1249.
16. KRAUS, GERLACH, SCHWEINBURG. *Lyssa bei Mensch und Tier*. Berlin, 1926, p. 264.
17. LÖFFLER et SCHWEINBURG. *Centr. f. Bakt. Orig.*, 115, 1930, p. 314.
18. MARIE (A.). *Ces Annales*, 1912, p. 441.
19. METCHNIKOFF (E.). Les cytotoxines. *Revue Générale des Sciences*, 1901.
20. PIRONE. Cité d'après L. Bory.
21. SACHS (H.). Hämolysische Serumwirkung (Hämolysine) und Komplementbindung cytotoxische Sera. *Handb. der pathogenen Mikroorg.* 2, Erster Teil, p. 779-928; Die Hämolysine und ihre Bedeutung für die Immunitätslehre. *Lubarsch. Ostertags Erg. d. pathol. Anat.*, 7, Jahr. Bergmann, Wiesbaden, 1902 ; *Biochem., Zbl.*, 1, 1903 ; Hämolysine und Cytotoxine des Blutserums. *Handb. d. Technik u. Methodik d. Imm. Forsch.*, 2, 1909.
22. SCHNIDT. *Ces Annales*, 20, 1906, p. 601.
23. WEINBERG (M.) et LÉGER (M.). Acquisitions récentes sur l'éosinophilie. *Traité du sang*, Paris, 1932, p. 196-221.
24. WITEBSKY (E.). *Zeits. f. Imm. Forsch.*, 51, 1927, p. 161 ; *Zeits. f. Imm. Forsch.*, 59, 1928, p. 297.
25. WITEBSKY (E.) et STEINFELD (J.). *Zeits. f. Imm. Forsch.*, 58, 1928, p. 271.

PUSTULE VACCINALE ET ANTIVIRUSTHÉRAPIE

ESSAI D'UN VACCIN SENSIBILISÉ

Par MM. P. GORET et J. TARDIEU.

(Institut Pasteur et École vétérinaire d'Alfort).

La question de la flore microbienne de la lymphe vaccinale a fait l'objet de nombreuses recherches bactériologiques et expérimentales. Divers auteurs ont étudié les différentes espèces microbiennes rencontrées dans la pulpe vaccinale et leur pouvoir pathogène vis-à-vis des animaux de laboratoire.

La question mérite, en effet, d'être retenue. Les uns ont pu accuser les souillures adventices de la vaccine de provoquer quelquefois des complications chez les vaccinés et, en tout cas, des réactions phlegmasiques contraires à l'évolution de la pustule vaccinale. Les autres, pensent que la réaction inflammatoire est due seulement au virus vaccinal, comme semblent le démontrer les expériences réalisées avec des pulpes amicrobiennes.

Quoi qu'il en soit, il apparaît cependant que le rôle des germes infectieux renfermés dans une lymphe même purifiée est loin d'être négligeable dans la production des réactions inflammatoires, et qu'ils contribuent sans doute à la formation et à l'évolution de l'aréole phlegmasique.

Dans ces conditions, nous avons pensé qu'il pouvait être intéressant de tenter d'obtenir une pustule vaccinale pure, sans réaction inflammatoire, soit en vaccinant localement la peau contre les germes adventices, au moyen d'un antiviral spécifique; soit en utilisant une vaccine préalablement sensibilisée par un sérum antimicrobien également spécifique des microbes isolés.

Nos expériences ont porté sur de nombreux lapins et nous ont fourni chaque fois des résultats comparables. Nous ne rapporterons ici que les principales.

*
* *

Nous avons utilisé de la lymphe vaccinale glycinée mise aimablement à notre disposition par M. le Dr Fasquelle, directeur de l'Institut de la vaccine animale.

Les germes étaient isolés par ensemencement de la lymphe sur gélose inclinée, bouillon Martin et bouillon-sérum, ce dernier milieu permettant, comme on le sait, un isolement rapide du streptocoque.

L'opération, répétée à partir de plusieurs tubes de vaccin, nous permit d'isoler les germes suivants, à l'exclusion de tout autre :

1. Un streptocoque pouvant, par ses caractères, se rattacher à l'espèce *Str. pyogenes* (Rosenbach).



FIG. 1. — Lésions provoquées par inoculation intradermique, chez le lapin, du streptocoque isolé de la lymphe vaccinale.

2. *Staphylococcus pyogenes albus*.
3. *Staphylococcus pyogenes aureus*.
4. *Bacillus subtilis*.
5. *Bacillus mesentericus*.

Nous avons étudié chez le lapin la virulence des germes isolés, par la technique de l'inoculation intracutanée décrite par Kasahara et utilisée depuis par Dold. Par ailleurs, nous avons étudié également leur pouvoir pathogène par la voie veineuse chez le chien et le lapin et par scarifications sur la cornée de lapin.

Le streptocoque isolé s'est seul montré capable de produire par inoculation intradermique uniquement et chez le lapin, aux doses de 0 c. c. 1, 0 c. c. 3 et 0 c. c. 5 d'une culture en bouillon de vingt-quatre heures, des lésions cutanées très nettes. Il s'agit de pustules comparables, au début, par certains de leurs caractères, aux pustules vaccinales (rougeur, gonflement, infiltration), mais se transformant rapidement en de véritables escarres humides, entourées d'une zone inflammatoire assez étendue (fig. 1). Ces escarres tombent d'ailleurs longtemps après leur formation ; la lésion évolue en trente à trente-cinq jours environ.

*
* *

Parmi les germes isolés par nous, c'est donc surtout le streptocoque qui possède un certain pouvoir pathogène capable de provoquer sur la peau du lapin de fortes réactions inflammatoires. Quoi qu'il en soit, et comme nous l'avons dit plus haut, dans le but de vérifier si les germes renfermés dans la lymphe vaccinale jouent un rôle dans la réaction inflammatoire consécutive à l'inoculation, nous avons préparé un « antivirus » à partir des 5 souches isolées et immunisé localement la peau au moyen de cet antivirus, avant l'inoculation du vaccin.

Les germes sont cultivés séparément sur bouillon de veau peptoné pendant quinze jours, au bout de ce temps, les milieux sont filtrés sur bougie L3 ; les filtrats rassemblés constituent l'antivirus polyvalent spécifique.

Voici en détail deux de nos expériences :

EXPÉRIENCE I. — 2 lapins, préalablement rasés d'un côté du corps, sont pansés trois jours de suite avec de l'antivirus polyvalent spécifique. Les pansements sont laissés en place pendant vingt-quatre heures et renouvelés au bout de ce temps.

Un lapin reçoit de la même manière une seule application d'antivirus spécifique.

Le lendemain de la dernière application, les 3 lapins reçoivent sur la peau rasée et traitée, en trois points différents, du virus vaccinal introduit dans le derme par légères scarifications à l'aide d'une lancette. On vaccine également un lapin neuf témoin.

La pustule vaccinale évolue de façon sensiblement comparable chez tous les lapins jusqu'au quatrième jour. A partir de ce moment, au contraire, une pustule vaccinale pure, sans aréole phlegmasique, à ombilication précoce, se développe chez les animaux traités par l'antivirus. Parallèlement, on assiste, chez le lapin témoin, à l'évolution habituelle de la pustule vac-



FIG. 2. — (Expér. I). Eruption vaccinale chez le lapin témoin (9^e jour) : réaction inflammatoire et extension des lésions.



FIG. 3. — (Expér. I). Eruption vaccinale chez le lapin traité (9^e jour) : aucune réaction inflammatoire.



FIG. 4. — (Expér. II). Eruption vaccinale chez le lapin témoin (9^e jour) : forte réaction inflammatoire péripustuleuse.



FIG. 5. — (Expér. II). Eruption vaccinale chez le lapin traité par l'antivirus (9^e jour) : aucune réaction inflammatoire.

cinale, c'est-à-dire accompagnée d'une forte réaction inflammatoire péri-pustuleuse.

Au neuvième jour, on note suivant les animaux observés une différence considérable dans l'allure et l'extension des lésions, comme le montrent les figures 2 et 3.

Chez le lapin témoin : lésions étendues légèrement suppuratives, croûtelles plates légèrement escarrifiées, forte inflammation péri-pustuleuse.

Chez le lapin traité trois jours de suite : lésions localisées, nettes, à contours définis, croûtelles sèches, sans aucune réaction inflammatoire périphérique. Les lésions présentent déjà une tendance à la régression.

Il peut être intéressant de noter, cependant, une réaction inflammatoire légère mais nette chez le lapin n'ayant reçu qu'une seule application d'antivirus.

EXPÉRIENCE II. — Dans cette expérience, nous avons voulu mettre en évidence, d'une façon absolue, le rôle joué par l'antivirus dans les phénomènes que nous avons observés dans l'expérience précédente.

Deux lapins reçoivent, dans les conditions de l'expérience précédente, trois applications successives d'antivirus spécifique.

Un lapin reçoit de la même façon trois applications successives d'un antivirus non spécifique, préparé à partir de souches diverses de streptocoques et staphylocoques non isolées de la vaccine.

Un lapin reçoit trois applications de bouillon peptoné ordinaire.

Le lendemain de la dernière application, on vaccine les 4 lapins traités et un témoin.

Les résultats furent en tous points comparables à ceux déjà notés dans l'expérience précédente.

Comme en témoignent les figures 4 et 5, voici ce que l'on observait au niveau des lésions neuf jours après l'inoculation vaccinale :

Chez le lapin témoin, et plus encore chez le lapin traité par les applications de bouillon peptoné : très grosse réaction inflammatoire péri-pustuleuse, pas d'extension des lésions, mais réaction adénolymphatique intense.

Chez le lapin traité par l'antivirus non spécifique, on note une très nette réaction inflammatoire, mais cependant un peu moins considérable que chez les précédents.

Enfin, chez les lapins traités par l'antivirus spécifique, la lésion est nette, bien ombiliquée, et ne manifeste aucune réaction inflammatoire périphérique.

De ces expériences, on peut donc conclure que l'antivirus préparé à partir des germes rencontrés dans la lymphe vaccinale est susceptible, lorsqu'il est appliqué sur la peau, avant l'inoculation vaccinale, d'empêcher l'évolution des phénomènes inflammatoires locaux habituellement constatés. Partant, il semble que, supprimant les phénomènes congestifs et inflammatoires, l'antivirus hâte l'évolution de la pustule vaccinale, la lésion guérissant plus vite chez les sujets traités que chez les témoins.

*
* *

Dans une seconde série de recherches, nous avons voulu nous rendre compte s'il était possible d'obtenir des résultats semblables en utilisant de la vaccine ayant subi le contact prolongé d'un sérum antimicrobien dirigé contre les germes spécifiques isolés de la pulpe. Autrement dit, nous avons voulu réaliser une vaccine sensibilisée d'un caractère particulier.

Nous avons obtenu par le procédé suivant un sérum très riche en sensibilisatrices spécifiques des divers germes.

3 lapins furent traités comme suit :

Le 30 janvier 1933 : inoculation sous-cutanée de 20 cent. cubes d'une émulsion en eau physiologique de la culture sur gélose des différents germes. L'émulsion est chauffée une demi-heure à 65°.

Le 2 février 1933 : 15 cent. cubes de la même émulsion dans la veine.

Le 3 février 1933 : 15 cent. cubes de la même émulsion sous la peau.

Le 4 février 1933 : 10 cent. cubes de la même émulsion dans la veine.

Le 7 février 1933 : 1/2 centigramme dans les veines de germes tués par l'alcool-éther.

Le 16 février 1933 : même traitement.

Le 18 février 1933 : même traitement.

Le 27 février 1933 : même traitement.

Le 9 mars 1933 : 10 cent. cubes d'une émulsion sur gélose de germes vivants dans la veine.

Le 10 mars 1933 : même traitement.

Le 13 mars 1933 : même traitement.

Le 14 mars 1933 : 20 cent. cubes de l'émulsion vivante dans la veine.

Les animaux sont saignés à blanc douze jours après, soit le 26 mars.

On prépare, à l'aide du sérum obtenu, une vaccine sensibilisée, de la vaccine fraîche étant mise en contact de notre sérum pendant trois jours à la glacière (+ 4°). Au bout de ce temps, le mélange sérum-lymphe vaccinale était centrifugé, la lymphe recueillie, lavée à l'eau physiologique, centrifugée, puis utilisée.

On prépare de la même manière une vaccine soumise pendant trois jours à la glacière à l'action du sérum normal de lapin.

D'autre part, la vaccine pure est également mise à la glacière trois jours de suite, elle servira de témoin.

Le 4 avril, on procède aux inoculations des lapins, sur la peau rasée comme dans les précédentes expériences de la manière suivante :

2 lapins sont vaccinés avec la vaccine sensibilisée.

1 lapin est vacciné avec la vaccine soumise à l'action du sérum normal de lapin.

1 lapin est vacciné avec de la vaccine pure.

Les résultats sont, en gros, comparables à ceux de l'expé-

rience antérieure. Néanmoins, ceux-ci sont beaucoup moins appréciables.

Voici ce que l'on peut observer, le 13 avril, neuf jours après la vaccination :

Lapin traité au virus pur : réaction habituelle, grosse inflammation à la périphérie de la lésion.

Lapin traité au virus ayant subi le contact du sérum normal de lapin : inflammation périputuleuse mais nettement moins étendue que dans la réaction normale.

Lapins traités au virus sensibilisé : une inflammation légère subsiste, cependant moins accentuée que dans les cas qui précèdent.

Dans trois autres expériences semblables, nous avons obtenu des résultats identiques.

*
* *

Le sérum normal de lapin possède donc par lui-même le pouvoir d'atténuer la virulence des éléments qui entrent en jeu dans la formation de l'aréole phlegmasique vaccinale. Ce pouvoir, comme on pouvait s'y attendre, est accru pour un sérum de lapin riche en anticorps spécifiques des germes adventices de la vaccine.

Toutefois, la différence qui existe entre les lésions des lapins témoins et des lapins traités, quoique nette, n'est pas comparable à celle observée lors des expériences semblables réalisées avec l'antivirus spécifique.

BIBLIOGRAPHIE

- BELENKY et POPOWA. *Zentr. f. Bakt.*, I, **110**, 1929, 170 ; **112**, 1 ; **118**, 1930, 435 ; *Zeitsc. f. Hygiene*, **109**, 1929, 443 et 453.
- BESREDKA. *Etudes sur l'immunité dans les maladies infectieuses*. 1 vol. Masson, édit. Paris ; *Immunisation locale. Pansements spécifiques*. 1 vol. Masson, édit. Paris, 1925 ; *Antivirusthérapie*. 1 vol. Masson, édit. Paris, 1930.
- CASAGRANDE. *Ann. d'Ig. sper.*, **16**, 1906, 577.
- CODDINGTON BROWN. *J. of Path. and Bact.*, **9**, 1903, 154.
- DUJARIC DE LA RIVIÈRE et PAROCKA. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **104**, 1930, 367 et 369.
- DUVOIR. *Etude sur la variole. Vaccine. Thèse de Doctorat*. Paris, 1911.
- HILGERS. *Zent. f. Bakt.*, I, **119**, 1930, 193.
- KELSCH, CAMUS et TANON. *Bull. Acad. Med.*, **58**, 1907, 111 ; **60**, 1908, 128 ; **61**, 1909, 445 ; **64**, 1910, 55.

- LEONI. *Compte rendu du Congrès de la vaccine de Rome*, 1894.
- LESIEUR et MAGNIN. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **75**, 1913, 683.
- LEVY. *Münch. Med. Woch.*, **51**, 1904, 307.
- ROSENAU. *Hyg. Lab. Washington*, 1903; *Bull.*, n° 12.
- STRAUSS. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **34**, 1882, 585.
- STRAUSS, CHAMBON et SAINT-YVES MÉNARD. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **62**, 1890, 721.
- TEISSIER et TANON, Vaccine dans *Nouveau traité de Médecine de Roger, Vidal et Teissier*, 1922, fascicule 2. Masson, édit.
- TOMARKIN et SEREBRENIKOFF. *Arch. f. Sch. u. Trop. Hyg.*, **14**, 1910, 429.
- VOIGT. *Sammlung. Klin. Vert.*, Hambourg, 1901, n° 353.
- DE WAELE et SUG. *Zentr. f. Bakt.*, I, **39**, 1905, 46, 142 et 324.
- WURTZ, TEISSIER, CAMUS, TANON, MARIE. *Bull. Ac. Méd.*, **69**, 1913, 65.

TABLE DES MATIÈRES

DU TOME LIII

La réorganisation de l'Institut Pasteur, par Alfred LACROIX	5
L'ingestion journalière de petites quantités d'aluminium favorise-t-elle le cancer? par Gabriel BERTRAND et P. SERBESCU	10
Transmission expérimentale de la syphilis à l'espèce bovine, par Antoine BÉCLÈRE.	23
Sur la présence du virus rabique dans le poumon, par P. REMLINGER et J. BAILLY.	43
Recherches sur les variations biologiques du virus tuberculeux, par J. VALTIS et F. VAN DEINSE.	51
Recherches sur les protéides du bacille tuberculeux et les anticorps antiprotéidiques tuberculeux, par W. SCHEFFER et G. SANDOR	72
Action des rayons solaires sur les spores de bactéries pathogènes pour les insectes, par S. S. MÉTALNIKOV fils	93
Un type de maladie à prémunition : le paludisme des passereaux à <i>Plasmodium relictum</i> , par Edm et Et. SERGENT et A. CATANEI	101
Infection expérimentale des lapins et titrage des sérums antimicrobiens par la méthode sous-arachnoïdienne. (Étude du méningocoque, du cocco-bacille de Pfeiffer, du pneumocoque et du streptocoque), par P. ZDRODOWSKI et H. GOLINEWITCH	120
Sur les relations entre la démence précoce et la tuberculose. I. Étude sérologique, par Adolf BECK.	156
Contribution à l'étude des réactions allergiques croisées dans la tuberculose et la brucellose, par W. SARNO-WIEC	166

La lutte contre la maladie du sommeil au Cameroun, par R. LEDENTU.	174
Sur les processus intermédiaires dans la dégradation des glucides (formation d'acide lactique et fermenta- tion alcoolique), par Otto MEYERHOF.	221
Le virus syphilitique : ses variations morphologiques, sa multiplication et son action pathogène, par W. NYKA	243
Un nouveau phénomène pour la démonstration de la toxicité du sérum, par A. BAUMANN et E. WITEBSKY. .	282
Les dysenteries infectieuses du ver à soie, par A. PAILLOT.	290
Caractères généraux et pouvoir pathogène expérimental de l' <i>Actinomyces israeli</i> , par M ^{lle} O. GROOTTEN . . .	311
L'infection mixte strepto-diptérique. Recherches expé- rimentales, par G. RAMON et M. DJOURICHITCH. . . .	325
Étude sur le sarcome de la souris, par A. BESREDKA et L. GROSS	341
Recherches sur l'importance physiologique du nickel et du cobalt, par Gabriel BERTRAND et HIROSI NAKAMURA.	371
Recherches sur certaines propriétés physiques des sérum sanguins, par Maurice DOLADILHE.	379
Étude de l'immunité des chenilles de <i>Galleria mellonella</i> envers les différents types de bacilles tuberculeux, par M ^{lle} M. BIRON (planche I)	404
Étude sur la morphogénèse des corps de Negri, par M. NICOLAU et L. KOPCOWSKA (planche II).	418
Morphologie et évolution du microbe de l'agalaxie con- tagieuse des ovins et des caprins dans les milieux nutritifs, par le professeur NOWAK et IWO LOMINSKI (planche II bis).	438
† M ^{me} René VALLERY-RADOT. (Notice nécrologique). . . .	453
Étude sur les inclusions de la fièvre jaune, par S. NI- COLAU, L. KOPCOWSKA et M. MATHIS	455
Nouveaux essais de prémunition antituberculeuse par le vaccin BCG chez les indigènes d'Algérie. (<i>Deuxième mémoire</i>), par H. FOLEY et L. PARROT	509
Élimination urinaire du bismuth après injection de diffé- rents types de préparations bismuthiques, par Jean POUZERGUES.	535

Contribution à l'étude de la maladie d'Aujesky, par Démètre JONNESCO	554
Sur les rapports entre les processus chimiques et phy- siques dans la contraction musculaire, par Otto MEYERHOF.	565
Études sur les antigènes fixateurs des bacilles tubercu- leux (<i>premier mémoire</i>). Antigènes fixateurs con- tenus dans les substances lipoïdiques extraites de bacilles tués par la chaleur, par Michel A. MACHE- BŒUF et Georgette LÉVY, avec la collaboration de M. CHAMBAZ.	591
Histo-cytologie des réactions locales d'hypersensibilité chez le cobaye. (Réactions allergiques à la tubercu- line et réactions anaphylactiques), par R. LAPORTE .	598
L'oxytrophie et la nutrition des Flagellés leucophytes, par André LWOFF et Hisatake DUSI	641
Application de la méthode des cultures de tissus à l'étude du typhus exanthématique. V. Nouvelles expériences de culture du virus du typhus exanthé- matique par de nouveaux procédés, par A. A. KRON- TOWKY, M. C. JAZIMIRSKA-KRONTOWKA, H. P. SAVITSKA et P. L. SOLITERMAN	654
Recherches sur l'immunité naturelle contre la rage du chien et sur les neurotoxines, par Démètre JONNESCO.	664
Pustule vaccinale et antivirusthérapie. Essai d'un vaccin sensibilisé, par P. GORET et J. TARDIEU.	681

TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

DU TOME LIII

BAILLY (J.)	Voir Remlinger (P.).	
BAUMANN (A.) et E. WITEBSKY.	Un nouveau phénomène pour la démonstration de la toxicité du sérum.	282
BECK (Adolf)	Sur les relations entre la démence précoce et la tuberculose. I. Étude sérologique.	156
BÉCLÈRE (Antoine).	Transmission expérimentale de la syphilis à l'espèce bovine	23
BERTRAND (Gabriel) et NAKAMURA (Mirosi)	Recherches sur l'importance physiologique du nickel et du cobalt.	371
BERTRAND (Gabriel) et SERBESCU (P.).	L'ingestion journalière de petites quantités d'aluminium favorise-t-elle le cancer?	10
BESREDKA (A.) et GROSS (L.).	Étude sur le sarcome de la souris	341
BIRON (M ^{lle} M.)	Étude de l'immunité des chenilles de <i>Galleria mellonella</i> envers les différents types de bacilles tuberculeux (planche I)	404
CATANEI (A.)	Voir Sergent (Edm. et Ét.).	
CHAMBAZ (M.)	Voir Machebœuf (A.).	
DJOURICHITCH (M.)	Voir Ramon (G.).	
DOLADILHE (Maurice).	Recherches sur certaines propriétés physiques des sérums sanguins.	379
DUSI (Hisatake)	Voir Lwoff (André).	
FOLKY (H.) et PARROT (L.)	Nouveaux essais de prémunition antituberculeuse par le vaccin BCG chez les indigènes d'Algérie (<i>deuxième mémoire</i>)	509
GOLINEWITCH (H.)	Voir Zdrodowski (P.).	
GORET (P.), et TARDIEU (J.).	Pustule vaccinale et antivirusthérapie. Essai d'un vaccin sensibilisé.	681
GROOTTEN (M ^{lle} O.).	Caractères généraux et pouvoir pathogène expérimental de l' <i>Actinomyces israeli</i>	311

GROSS (L.)	Voir Besredka (A.).	
JAZIMIRSKA-KRONTOWSKA (M. C.)	Voir Krontowsky (A. A.).	
JONNESCO (Démètre)	Contribution à l'étude de la maladie d'Aujesky.	554
—	Recherches sur l'immunité naturelle contre la rage du chien et sur les neurotoxines	664
KOPCIEWSKA (L.)	Voir Nicolau (S.).	
KRONTOWSKY (A. A.), JAZIMIRSKA-KRONTOWSKA (M. C.), SAVITSKA (H. P.) et SOLITERMAN (P. L.)	Application de la méthode des cultures de tissus à l'étude du typhus exanthématique. V. Nouvelles expériences de cultures du virus du typhus exanthématique par de nouveaux procédés	654
LACROIX (Alfred)	La réorganisation de l'Institut Pasteur	5
LAPORTE (R.)	Histo-cytologie des réactions locales d'hypersensibilité chez le cobaye (Réactions allergiques à la tuberculine et réactions anaphylactiques)	598
LEDENTU (G.)	La lutte contre la maladie du sommeil au Cameroun	174
LÉVY (Georgette)	Voir Machebœuf (A.).	
LOMSKY (Iwo)	Voir Nowak (professeur).	
LWOFF (André) et DUSI (Hisatake)	L'oxytrophie et la nutrition des flagellés leucophytes.	641
MACHEBŒUF (A.) et LÉVY (Georgette), avec la collaboration de M. CHAMBAZ.	Études sur les antigènes fixateurs des bacilles tuberculeux (<i>premier mémoire</i>). Antigènes fixateurs contenus dans les substances lipoidiques extraites de bacilles tués par la chaleur.	591
MATHIS (M.)	Voir Nicolau (S.).	
MÉTALNIKOV (S. S.)	Action des rayons solaires sur les spores de bactéries pathogènes pour les insectes	9
MEYERHOF (Otto)	Sur les processus intermédiaires dans la dégradation des glucides (formation d'acide lactique et fermentation alcoolique)	221

TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

695

MEYERHOF (Otto).	Sur les rapports entre les processus chimiques et physiques dans la contraction musculaire	565
NAKAMURA (Hiroshi).	Voir Bertrand (Gabriel).	
NICOLAU (S.) et KOPCIOWSKA (L.)	Étude sur la morphogénèse des corps de Negri (planche II).	418
NICOLAU (S.), KOPCIOWSKA (L.) et MATHIS (M.).	Étude sur les inclusions de la fièvre jaune.	455
NOWAK (prof.) et LOMINSKI (Iwo).	Morphologie et évolution du microbe de l'agalaxie contagieuse des ovins et des caprins dans les milieux nutritifs (planche II bis)	438
NYKA (W.)	Le virus syphilitique; ses variations morphologiques, sa multiplication et son action pathogène	243
PAILLOT (A.)	Les dysenteries infectieuses du ver à soie	290
PARROT (L.).	Voir Foley (H.).	
POUZERGUES (Jean).	Élimination urinaire du bismuth après injection de différents types de préparations bismuthiques	535
RAMON (G.), DJOURICHITCH (M.).	L'infection mixte strepto-diptérique. Recherches expérimentales.	323
REMLINGER (P.) et BAILLY (J.).	Sur la présence du virus rabique dans le poumon	43
SANDOR (G.).	Voir Schaefer (W.).	
SARNOWIEC (W.).	Contribution à l'étude des réactions croisées dans la tuberculose et la brucellose.	166
SAVITSKA (H. P.).	Voir Krontowsky (A. A.).	
SCHAEFER (W.) et SANDOR (G.).	Recherches sur les protéides du bacille tuberculeux et les anticorps antiprotéidiques tuberculeux.	72
SERBESCU (P.).	Voir Bertrand (Gabriel).	
SERGENT (Edm. et Ét.) et CATTANEI (A.).	Un type de maladie à prémunition : le paludisme des passereaux à <i>Plasmodium relictum</i>	101
SOLITERMANN (P. L.).	Voir Krontowsky (A. A.).	
TARDIEU (J.).	Voir Goret (P.).	
† VALLERY-RADOT (M ^{me} René).	Notice nécrologique	453
VALTIS (J.) et van DEINSE (F.).	Recherches sur les variations biologiques du virus tuberculeux	51

VAN DEINSE (F.)	Voir Valtis (J.).	
WITEBSKY (E.).	Voir Baumann (A.).	
ZDRODOWSKI (P.) et GOLINE- WITCH (H.).	Infection expérimentale des lapins et titrage des sérums antimicrobiens par la méthode sous-arachnoidienne (étude du méningocoque, du cocco- bacille de Pfeiffer, du pneumocoque et du streptocoque)	420

ERRATUM

Mémoire NICOLAU, KOPCIOWSKA et MATHIS, novembre 1934, page 471, 15^e ligne;
au lieu de : *qui ont été prises par Findlay pour des inclusions*, lire : dont Hurst
et Findlay ont pensé qu'elles pouvaient être des inclusions.

Le Gérant : G. MASSON.